

# ИФАВ РАН:

## основные направления и результаты работ

2018



40 лет  
ИФАВ РАН



**Институту физиологически  
активных веществ  
Российской академии наук  
40 лет**

**ИФАВ РАН:  
основные  
направления  
и результаты  
работ**

**2018**

УДК 616.894-053.8; 541.69:54(091)

ББК 54.1

И71

DOI: 10.18097/IPAC-RAS-2018

**И71**    Институту физиологически активных веществ Российской академии наук 40 лет. **ИФАВ РАН: основные направления и результаты работ.**  
Под ред. член-корр. Российской академии наук С.О.Бачурина.  
М.: Издательство «Типография 24», 2018. — 208 с., илл.

ISBN 978-5-00122-556-0

В сборнике статей сотрудников ИФАВ РАН, посвященном 40-летней годовщине со дня образования Института, представлены работы научного коллектива ИФАВ РАН по основным направлениям исследований и научным тематикам. Сборник охватывает ряд актуальных научных направлений, включая разработку мишень-ориентированных лекарственных средств, новые синтетические и технологические подходы в области медицинской и экологической химии, компьютерные методы дизайна лекарств, создание новых материалов и носителей на основе аэрогелей, а также фотоактивных и магнитных материалов на основе фталоцианинов.

ISBN 978-5-00122-556-0

УДК 616.894-053.8; 541.69:54(091)

ББК 54.1

© ИФАВ РАН, 2018

## Институту физиологически активных веществ Российской академии наук — 40 лет



Институт физиологически активных веществ Российской академии наук (ИФАВ РАН) в составе Ногинского научного центра РАН в Черноголовке был создан в соответствии с решением директивных органов и организован приказом Президиума академии наук за № 933 от 14 сентября 1978 года. Научно-методическое руководство Институтом было возложено на Отделение биохимии, биофизики и химии физиологически активных соединений АН СССР.

Решением Президиума АН СССР были определены следующие основные направления научной деятельности Института:

— поиск, химический синтез, изучение строения и связи между химической структурой и физиологической активностью синтетических и природных физиологически активных веществ (ФАВ);

— исследование физиологической активности полученных веществ на биологических моделях и животных, изучение механизмов проявления физиологической активности;

— разработка систем поиска и оценки эффективности применения ФАВ с использованием биохимических и физико-химических методов, а также разработка рекомендаций по их практическому использованию в медицине, сельском хозяйстве и в других отраслях экономики.

Директором института стал доктор химических наук, профессор Иван Васильевич Мартынов, крупный организатор фундаментальных и прикладных исследований и новых химических производств в системе Министерства химической промышленности СССР, Лауреат Ленинской премии (1972 год), Герой социалистического труда (1974 год), кавалер 27 орденов и медалей. Именно первый директор предложил название института, которое он носит и по сей день.

В связи с истечением срока полномочий И.В.Мартынова в июне 1989 года директором ИФАВ РАН был избран видный российский ученый, академик Николай Серафимович Зефирин. С переходом Института в июне 1994 года в Отделение общей и технической химии (ныне Отделение химии и наук о материалах) были закрыты спецтематики, а также произошли изменения в структуре и научных направлениях Института. Однако в полной мере сохранились основные цели научной деятельности — формировать современные научные основы поиска и направленного отбора новых эффективных физиологически активных веществ для нужд медицины, сельского хозяйства и промышленности. На рубеже столетий формируется современная структура института, которая позволяет проводить комплексные исследования в области разработки новых лекарств. Ключевые элементы этой структуры — компьютерное моделирование биологической активности и предсказание на этой основе структур с заданными свойствами; разработка методов синтеза новых физиологически активных

веществ; разработка и применение передовых методов биологического тестирования химических соединений; изучение механизма действия соединений-лидеров.

В 2006 году ИФАВ РАН возглавил член-корреспондент РАН Сергей Олегович Бачурин, который до этого в течение 20 лет являлся заместителем директора по научной работе. Академик Н.С.Зефирин стал научным руководителем института. Современный облик института характеризуется активным внедрением современных исследовательских технологий «геномной эры», включая разработку трансгенных моделей заболеваний, высокопроизводительный биологический скрининг, передовые биохимические подходы. Активно совершенствуются традиционные направления исследований — алгоритмы компьютерного моделирования активности, оригинальные химико-синтетические подходы, передовые методы *in vitro* и *in vivo* тестирования химических соединений, изучение природных соединений. Реконструкция институтского вивария (2006–2009 гг.) привела к созданию высокотехнологичного современного Центра доклинических испытаний, предназначенного для комплексных доклинических исследования фармакологической активности и безопасности лекарственных препаратов. В соответствии с требованиями времени большое внимание уделяется инновационной деятельности, необходимой для внедрения передовых разработок в промышленность и здравоохранение. ИФАВ РАН вовлечен в масштабные государственные программы в области разработки лекарств и нанотехнологий.

Главная ценность Института — научный коллектив, объединяющий профессионалов высокой квалификации. В настоящее время в ИФАВ РАН работает 232 сотрудника, в том числе 130 научных сотрудников, включая 2 членов-корреспондентов РАН, 26 докторов наук и 68 кандидатов наук химических и биологических специальностей. В последние годы в институт активно приходит молодежь, и сегодня в каждой лаборатории можно найти молодых исследователей, активно перенимающих опыт своих старших коллег, осваивающих новейшие научно-исследовательские подходы, ищущих и находящих свои собственные пути.

\* \* \*

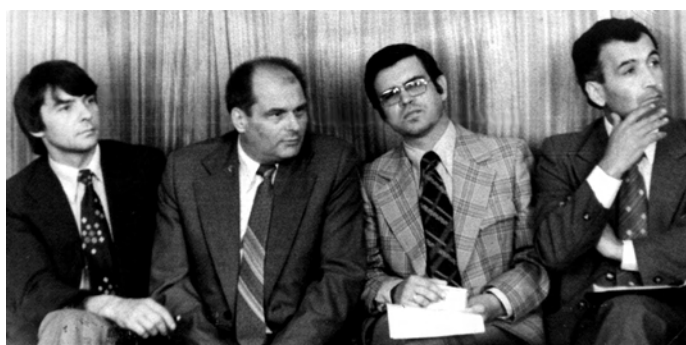
В сентябре 2018 года ИФАВ РАН отмечает 40-летие с момента основания. К этому рубежу зрелости Институт подошел, имея солидный багаж опыта и достижений. Разработки ИФАВ РАН отмечены Государственной премией, премией Правительства РФ в области науки и техники, Благодарностью Президента и другими многочисленными наградами. За время существования Института защищены десятки кандидатских и несколько докторских диссертаций, получены десятки патентов, опубликованы сотни научных работ. Преемственность профессионализма, научной мысли и замечательных традиций отечественной научной школы позволяет Институту уверенно смотреть в будущее. На фундаменте, построенном замечательными предшественниками, ученые ИФАВ РАН продолжают строить Российскую науку, мыслить и созидать.

## Историческая фотогалерея



Первые сотрудники ИФВ  
РАН (1979 год).

Сотрудники лаборатории элементарноорганических соединений на субботнике (1985 год). В первом ряду (слева направо): А. Антошин, А. Коркин, В. Рагулин, В. Калашников, В. Баулин. Во втором ряду: Т. Чепайкина, зав. лаб. Е. Н. Цветков, А. Яркевич, А. Бовин, М. Бофанова, Г. Зайцев, А. Харитонов, А. Руденко.



Молодые завлабы — В. В. Малыгин,  
Е. Н. Цветков, О. А. Раевский,  
Р. С. Агабекян (1980 год).


ИФАВ РАН  
строится... (1980 год)



«Решили выполнить часть строительных работ своими силами» (1978 год). На фото слева направо: М.И.Додонов, В.К.Брель, В.Б.Соколов, А.И.Юртанов, директор ИФАВ РАН И.В.Мартынов, С.А.Лермонтов, Ю.П.Белов.

Три директора. Член-корреспондент РАН С.О.Бачурин (директор ИФАВ РАН с 2006 года по настоящее время), академик Н.С.Зефилов (директор ИФАВ РАН с 1989 по 2005 гг.), член-корреспондент РАН И.В.Мартынов (первый директор ИФАВ РАН с 1978 по 1988 гг.).





Работы в области  
медико-биологических  
исследований





# Новые подходы к созданию препаратов для лечения болезни Альцгеймера и сходных нейродегенеративных заболеваний

С.О. Бачурин

*Отдел медицинской и биологической химии ИФАВ РАН*

## 1. Введение

Поиск эффективных средств для лечения нейродегенеративных заболеваний является одним из наиболее актуальных направлений современной биомедицинской химии. К этим заболеваниям относятся, в первую очередь, болезнь Альцгеймера (БА), паркинсонизм, боковой амиотрофический склероз (БАС) и ряд других заболеваний мозга.

БА является наиболее распространенной формой деменций в пожилом возрасте, для которой характерно неуклонное снижение когнитивных функций и памяти вплоть до полного распада личности. По данным ВОЗ количество больных БА и близкими формами деменции в мире оценивается в 30–35 млн и удваивается примерно каждые 10 лет [1]. Ожидается, что к 2030 году число больных БА может достигнуть 70 млн чел. [2]. Общие затраты на лечение больных БА во всем мире в 2015 г. составили 818 миллиардов долларов США и могут возрасти до 2 триллионов к 2030 г. [2]. Мировой рынок фармпрепаратов для лечения БА в 2015 г. составлял 5.2 млрд долл. США и ожидается, что к 2020 году рынок увеличится более чем вдвое, до 11.3 млрд долл. США [3].

Проблема фармакотерапии деменции, и БА в частности, остро актуальна и для России. По данным клинико-эпидемиологического исследования репрезентативных групп пожилого населения Москвы примерно 4.5% или более 70 тыс.

человек в возрасте 60 и старше лет страдают деменцией альцгеймеровского типа, причем у 1.8% обследованных (более 30 тыс. чел.) выявлены выраженные и тяжелые, т.е. требующие постороннего ухода и надзора, формы слабоумия [4]. Экстраполяция полученных данных на население старших возрастов России в целом позволяет говорить о том, что уже в настоящее время общая численность больных, страдающих болезнью Альцгеймера, в России приближается к 1.4 млн человек. В связи со старением населения РФ показатель распространенности БА будет неуклонно расти, и к 2020 г. увеличится примерно на 30%, что составит около 1% всего населения страны [5].

В общих чертах БА характеризуется хроническим и прогрессирующим нейродегенеративным процессом, возникающим в результате внутриклеточного и внеклеточного накопления фибриллярных белков: бета-амилоида (Аβ) и гиперфосфорилированного тау-белка [6, 7]. Избыточное накопление таких агрегатов приводит к синаптической дисфункции и последующей гибели нейронов. При этом в наибольшей степени страдают холинэргическая и глутаматэргическая нейромедиаторные системы. В связи с этим именно эти две нейромедиаторные системы и являлись основным объектом направленного воздействия химических соединений, разрабатывавшихся для терапии БА, на протяжении многих лет. Так, на сегодняшний день наиболее широко применяемыми в клинической практике «анти-альцгеймеровскими» препаратами являются Donepezil (Aricept, Донепезил), Galantamine (Reminyl, Галантамин), Rivastigmine (Exelon, Ривастигмин), и Memantine (Noojerone, Мемантин). Первые три являются ингибито-

рами ацетилхолинэстеразы (АХЭ), а Мемантин является низкоаффинным неконкурентным антагонистом NMDA (N-метил-D-аспартата)-подтипа глутаматных рецепторов. Все эти препараты являются симптоматическими средствами и не могут замедлить развитие собственно нейродегенеративного процесса.

В значительной степени низкая эффективность применяемых лекарств обусловлена мультифакторной природой БА [8–10]. Это означает, что инициация заболевания может быть вызвана различными как внешними, так и генетическими факторами, а в процессе развития заболевания задействовано большое число различных нейробиологических структур, включая ферменты, ионные каналы, системы транспорта, естественные механизмы реакции клеток на нарушение внутриклеточного гомеостаза и многое другое. В этой связи попытки воздействовать только на одну мишень, пусть и важную, в развитии патологических нарушений редко приводят к формированию устойчивого терапевтического эффекта на целом организме.

В последнее десятилетие активно развиваются новые стратегии, призванные преодолеть недостатки подхода «одна мишень – одно соединение» в лечении заболеваний со сложным патогенезом, в частности, при нейродегенеративных заболеваниях. Одним из наиболее распространенных подходов является так называемая комбинированная терапия, т.е. использование комплекса лекарственных препаратов с различными мишенями действия. Это направление в настоящее время активно развивается, особенно в области исследования механизмов значительного изменения суммарного эффекта препаратов [11]. Альтернативный подход, который имеет значительные преимущества, — это разработка полифункциональных молекул, включающих структурные фрагменты, способные связываться либо с идентичными, либо с различными мишенями. При значительном увеличении эффективности влияния на патологические звенья заболевания, для этих соединений, в отличие от комбинации ряда препаратов, снижен побочный эффект избыточности препаратов. Для нейродегенеративных заболеваний этот подход наиболее актуален в силу многофакторности их нейрогенеза. Поэтому в последнее время особо важное значение придается поиску и созда-

нию инновационных лекарственных препаратов мультитаргетного действия, способных как компенсировать утрачиваемые функции, так и воздействовать на патогенез нейродегенеративных заболеваний [12, 13].

В качестве актуальных мишеней для поиска антиальцгеймеровских лекарственных препаратов выступают различные рецепторы или ферменты нейромедиаторных систем, взаимодействие с которыми может обеспечить стимуляцию когнитивных функций (холинэргические, глутаматные, серотониновые рецепторы, ферменты группы холинэстераз и т.д.), компоненты различных систем, связанных с патоморфологическими (и возможно и патогенетическими) особенностями этого заболевания: амилоидозом, нарушениями микротубулярной системы нейрона, а также подходы направленные на устранение дисфункций митохондрий и окислительного повреждения клеток. Так, в последние 3–4 года около 140 молекулярных мишеней было использовано в качестве основы действия препаратов проходивших доклинические и клинические испытания для лечения БА. Но при этом наиболее часто «используемых» мишеней значительно меньше. Так, у примерно 60 препаратов основным объектом действия является система образования и деградации  $\beta$ -амилоидного пептида, на порядок меньше препаратов проходят испытания, имеющие мишенью действия систему таубелков [14]. Активно развиваются в настоящее время стратегии поиска нейропротекторов, действующих на полимеризацию микротрубочек и регуляцию этого процесса, стабилизацию функций митохондрий и ряд других критичных для функционирования нервной клетки систем, причем для большинства препаратов в качестве вероятной мишени терапевтического действия заявлялась, как правило, несколько мишеней.

Появление первых бифункциональных препаратов для лечения болезни Альцгеймера связано с открытием двойственной роли ацетилхолинэстеразы (АХЭ) в развитии нейродегенерации альцгеймеровского типа: собственно ферментативная роль и способностью усиливать агрегацию  $\beta$ -амилоида, и соответственно, открытием двух активных центров связывания [15]. На основе уже используемых препаратов, таких как такрин, донепезил, галантамин, физостигмин, пропидиум и др., были созданы их

гомо- или гетеродимерные аналоги и показана их большая эффективность как лекарственных препаратов, но и большая активность по отношению к каждой из мишеней. Активно развивается также стратегия создания потенци-альных лекарственных препаратов, сочетающих активность по отношению к АХЭ с антиоксидантной активностью. Примерами могут быть конъюгаты мелатонина и такрина и липоевой, или фелуровой кислоты и такрина [16, 17].

В литературе есть данные о создании и исследовании биологической активности и нехолинэргических бифункциональных препаратов с другими типами действия: одновременным ингибированием моноаминоксидазы и ацетилхолинэстеразы, модуляторы активности альфа-или гамма-секретазы и рецепторов, активирующихся пероксисомными пролифераторами, и другие виды активностей [18, 19].

Анализ препаратов, находившихся на клинических испытаниях в 2015–2017 гг., позволил выявить, что примерно четверть всех разрабатываемых препаратов (из примерно 130 находившихся в испытаниях) обладает мультитаргетным действием [20].

## 2. Стратегия полифармакофорного конструирования препаратов для лечения БА

В рамках развития новых подходов с созданием препаратов для лечения БА и родственных нейродегенеративных заболеваний в Отделе медицинской и биологической химии ИФАВ РАН была развита стратегия конструирования оригинальных полифункциональных веществ, сочетающих в одной структуре несколько биологически активных фармакофоров, действующих на ключевые стадии патогенеза нейродегенеративного заболевания. Такие препараты могут являться либо мультитаргетными лекарствами, действующими на различные звенья патогенеза нейродегенеративных заболеваний, или сочетающими действие на патогенетическое звено и симптоматический эффект, либо совмещать разные фармакофоры, аддитивно действующие на одно и то же звено патогенеза («бинеры»), или конъюгатами, где к известному препарату присоединен дополнительный структурный фрагмент (например группа NO), что усиливает общий терапевтический эффект вещества.

Были разработаны новые синтетические алгоритмы конъюгирования различных фарма-

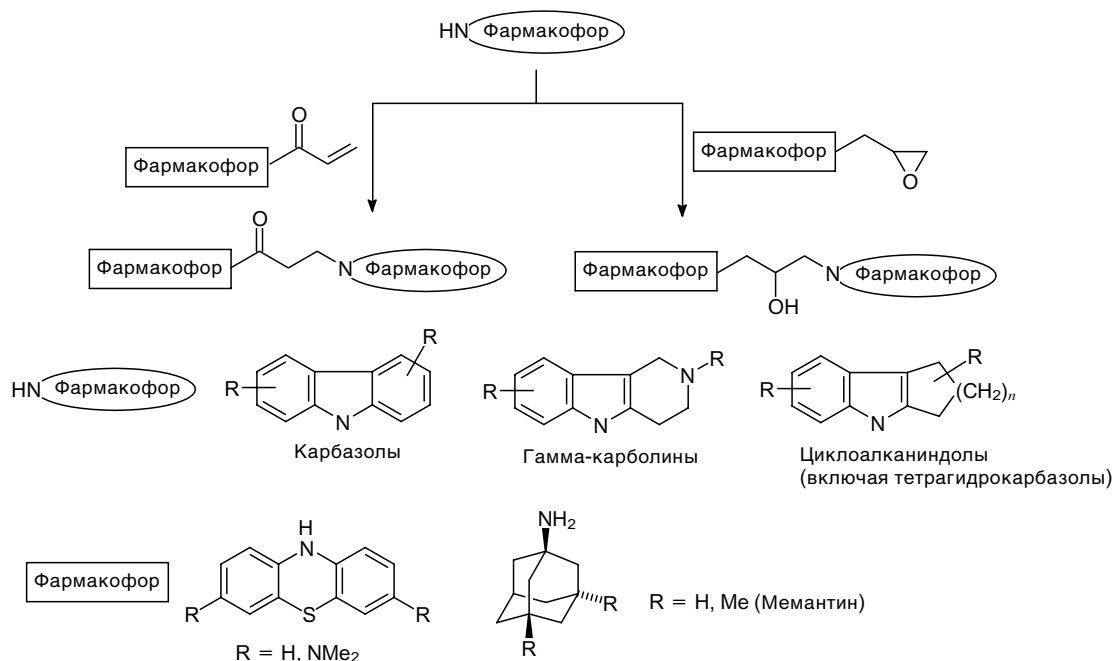


Рис. 1. Стратегия конструирования полифармакофорных соединений [21].



Рис. 2. Мишени для первичного скрининга потенциальных мультитаргетных нейропротекторных препаратов [45].

кофорных лигандов в единую структуру и изучение их активности по отношению к значимым мишеням *in vitro* с выявлением веществ-лидеров и последующим исследованием когнитивно-стимулирующих и нейропротекторных свойств в экспериментах *in vivo*, в том числе и на различных моделях нейродегенеративных заболеваний.

На рис. 1 приведена общая схема иллюстрирующая разработанные подходы и набор фармакофорных темплат использованных при конструировании оригинальных полифармакофорных соединений.

Выбор в качестве приоритетных фармакофорных групп гамма-карраболинов, фенотиазинов и адамантановых производных связан с тем, что в их ряду уже есть достаточно активные нейропротекторные и когнитивно-стимулирующие препараты, в частности, димебон [22], метиленовый синий [23] и мемантин [24]. Выбор производных карбазола связан с тем, что в недавних работах американских исследователей было показано, что некоторые конъюгаты производных карбазола с алкил- и ариламинами проявляют необычные пронейрогенные и нейропротекторные свойства [25].

Всего в рамках работ по проекту РФ 14-23-00160 было целенаправленно синтезировано около трехсот соединений с использованием различных комбинаций указанных фармакофорных темплат. Синтез и отдельные свойства соединений опубликованы в научной печати [26–39], а наиболее перспективные группы соединений защищены патентами РФ [40–43].

Оценка биологической активности соединений проводилась в отношении следующих молекулярных мишеней (рис. 2) [44, 45]:

- ингибирование ацетил- и бутирилхолинэстеразы, а также карбоксилэстеразы;
- действие на внутриканальный и аллостерический сайты NMDA-подтипа глутаматных рецепторов радиолигандным методом;
- действие на функциональную активность AMPA-рецептор-канального комплекса электрофизиологическим методом;

Параллельно оценивалось действие соединений некоторые ключевые нейробиологические системы участвующие в развитии нейродегенеративных процессов в клетках, а именно:

- на функциональные характеристики митохондрий (мембранный потенциал, вход

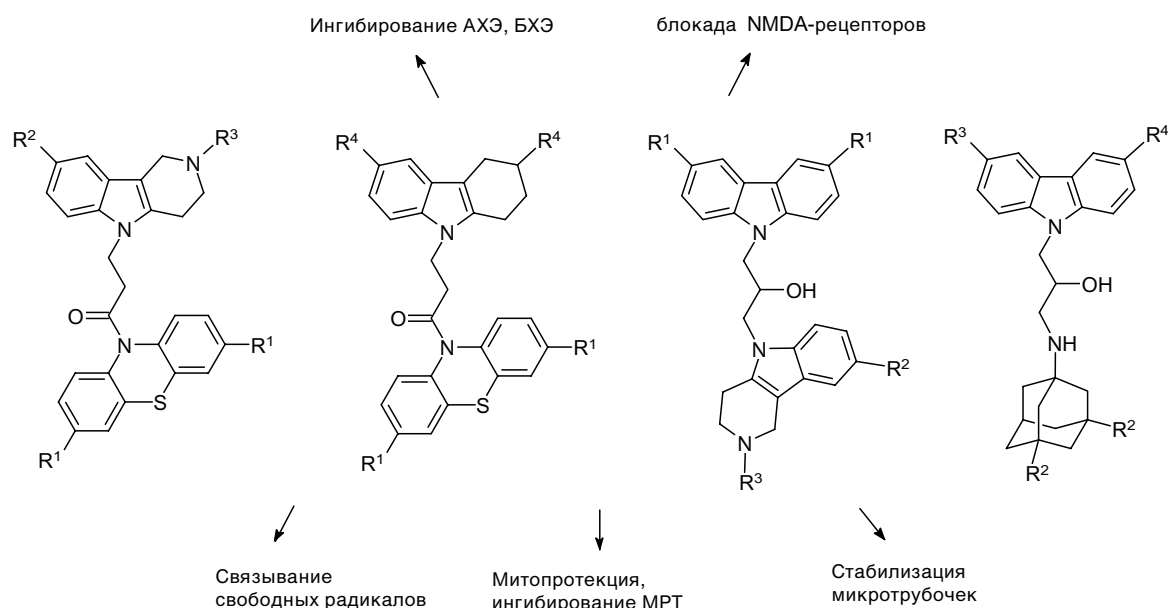


Рис. 3. Структурные хемотипы, представители которых проявили активность в отношении выбранных мишеней нейродегенеративных процессов [21].

кальция в митохондрии, митохондриальные поры);

— на полимеризацию тубулина и электрономикроскопическое исследование образовавшихся микротубулярных структур;

— оценка антирадикальной активности соединений с использованием ABTS-теста.

Наиболее перспективные соединения исследовались на культурах клеток, полученных от трансгенных животных (FUS- и 5FAD-трансгенных мышей) по способности влиять на процесс образования патологических агрегатов соответствующих белков в мозге.

Данные о биологической активности представленных соединений, полученные с использованием комплексной системы скрининга, позволили установить, что наиболее перспективными вариантами конъюгатов являются соединения следующих структурных типов (рис. 3) [21].

Было определено соединение-лидер (IPAC-2015) из ряда конъюгатов тетрагидрокарбазола и адамантана, по которому в 2017 году начаты расширенные доклинические испытания в рамках ФЦП «Фарма-2020».

Это соединение сочетает ряд свойств, обеспечивающих одновременное действие на целую совокупность биологических мишеней, участвующих в развитии нейродегенеративных про-

цессов в клетках. Наиболее значимым является действие на следующие мишени и процессы [44–46]:

— избирательное ингибирование бутирилхолинэстеразы ( $IC_{50}$  БУХЭ =  $5,4 \pm 0,4$  М).

— связывание с двумя сайтами NMDA-рецептора:

— внутриканальным (МК-801-связывающим)  $IC_{50}^{MK} = 27,4 \pm 4,1$  М;

— аллостерическим (ифенпролил-связывающим)  $IC_{50}^{Iph} = 10,4 \pm 2,9$  М.

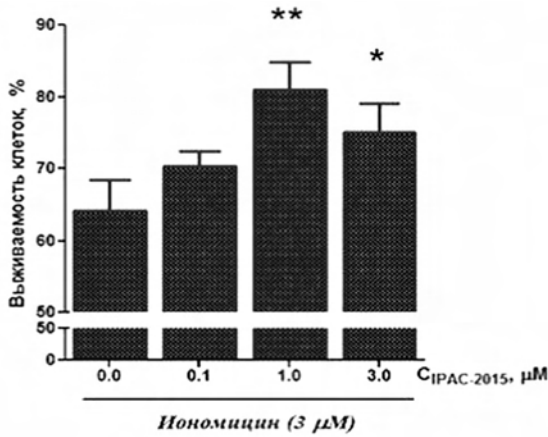
— стимулирование полимеризации тубулина на  $330 \pm 40\%$  с образованием микротрубочек упорядоченной («правильной») структуры. Важно отметить, что при этом исходные скаффолды — тетрагидрокарбазол и мемантин — не влияют на сборку микротрубочек!

— соединение ингибирует процесс открытия митохондриальных транспортных пор (МТП) — ключевой этап каскада клеточной гибели, снижают скорость кальций-индуцированного «набухания» митохондрий ( $IC_{50}^{MTP} \approx 10,0$  М);

— в экспериментах на клеточных культурах препарат предотвращает гибель клеток в условиях кальциевого стресса (рис. 4).

### 3. Выводы

Разработаны подходы к направленному конструированию и изучению свойств новых типов



**Рис. 4.** Защитное действие препарата IPAC-2015 на клетках в модели иономицин-вызванного кальциевого стресса [45].

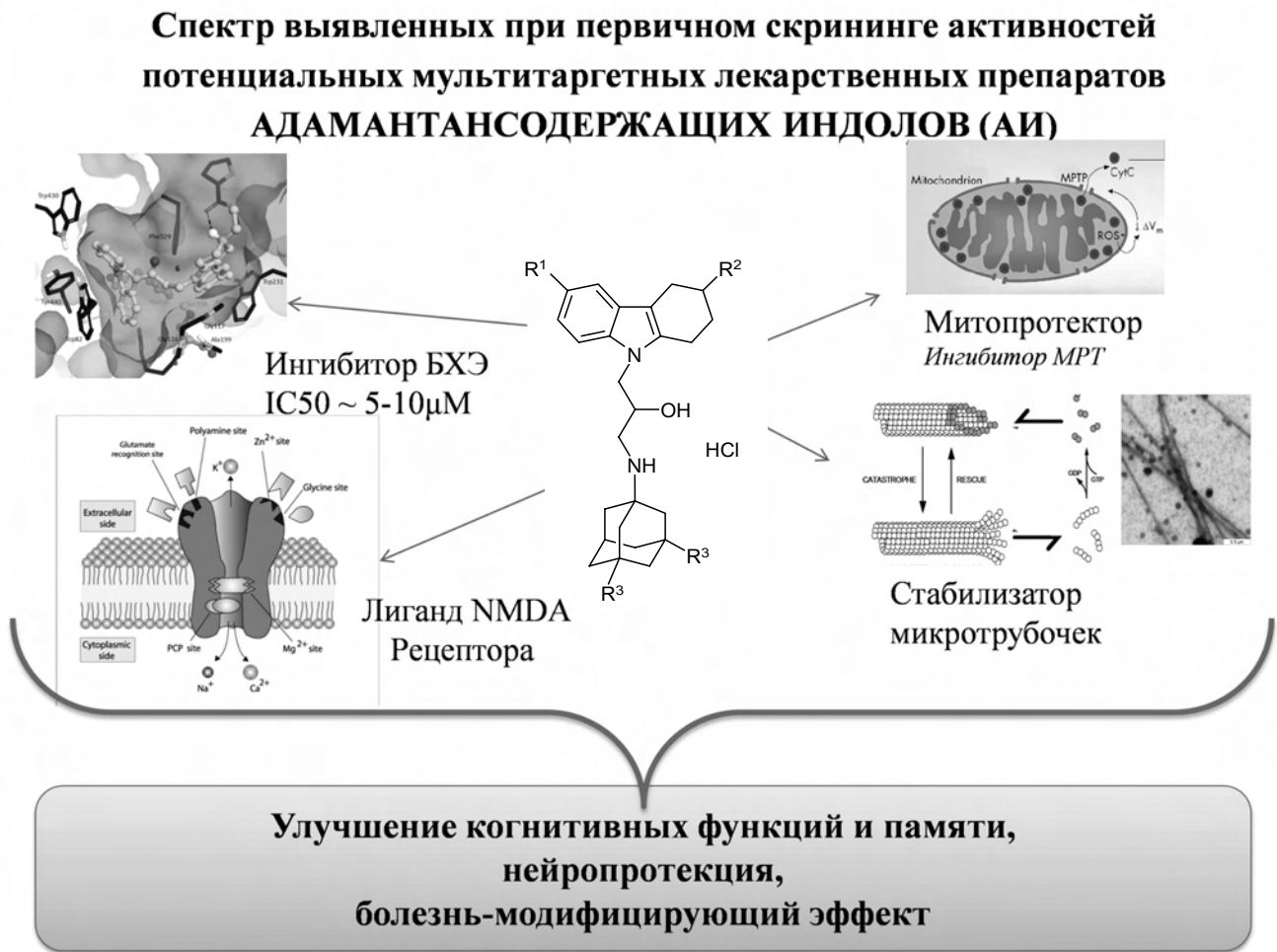
нейроактивных веществ, действующих на целую совокупность биомишеней, участвующих в патогенезе нейродегенеративных заболеваний. Определено соединение-лидер (IPAC-2015), прояв-

ляющее мультитаргетное воздействие на ряд ферментных, транспортных, рецепторных и митохондриальных систем ЦНС (рис. 5).

Проведенные доклинические исследования препарата по Государственному контракту 14.N08.11.138 показали его низкую токсичность ( $LD_{50} > 1 \text{ г} \cdot \text{кг}^{-1}$  на экспериментальных животных) и хорошие фармакокинетические свойства. Таким образом, данный препарат может рассматриваться как реальный кандидат на клинические испытания на больных, страдающих заболеваниями, связанными с нарушением функционирования митохондрий и микротубулярной системы ЦНС, в частности различными формами деменции.

**Литература**

1. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs362/ru/>
2. E.McDade, R.J.Bateman. *Nature*, **547** (7662),153 – 155 (2017)



**Рис. 5.** Основные направления действия соединения-лидера (препарат IPAC-2015) на биологические мишени и процессы, участвующие в развитии нейродегенеративных изменений в нервной системе [45].

3. Vademecum, 2016, №3 [https://vademec.ru/article/r\\_d\\_vsego\\_svyatogo/](https://vademec.ru/article/r_d_vsego_svyatogo/)
4. Я.Б.Кальн, С.И.Гаврилова, Н.М.Михайлова. *Современная терапия в психиатрии и неврологии*. № 2, 10–15 (2014)
5. Н.А.Язуина, Ю.К.Комлева, А.Б.Салмина, М.М.Петрова, Г.А.Морозова, Н.А.Малиновская. *Неврол. журн.*, № 5, 32–37 (2012)
6. E.Karran, M.Mercken, B.De Strooper. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **10** (9), 698–712 (2011)
7. R.V.Maccioni, G.Farias, I.Morales, L.Navarrete. *Arch. Med. Res.*, **41** (3), 226–231 (2010)
8. M.Carreiras, E.Mendes, M.Perry, A.Francisco, J.Marco-Contelles. *Cur. Top. Med. Chem.*, **13**, 1745–1770 (2013)
9. P.Talwar, J.Sinha, S.Grover, C.Rawat, S.Kushwaha, R.Agarwal, V.Taneja, R.Kukreti. *Mol. Neurobiol.*, **53** (7), 4833–4864 (2016)
10. J.I.Castrillo, S.G.Oliver. *Methods Mol Biol.*, **1303**, 3–48 (2016)
11. С.Т.Keith, А.А.Борисы, В.Р.Стоквелл. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **4**, 71–78 (2005)
12. M.G.Katselou, A.N.Matralis, A.P.Kourounakis. *Curr. Med. Chem.*, **21** (24), 2743–2787 (2014)
13. S.Das, S.Basu. *Curr. Top. Med. Chem.*, **17** (27), 3017–3061 (2017)
14. М.С.Кухарский, Р.К.Овчинников, А.А.Устюгов, С.О.Бачурин. В кн. *Нейродегенеративные заболевания: от генома до целостного организма. Том 2*. (Под ред. М.В.Угрюмова). Москва, Научный мир, 2014. С. 137–162
15. G.V.De Ferrari, M.A.Canales, I.Shin, L.M.Weiner, I.Silman, N.C.Inestrosa. *Biochemistry*, **40**, 10447–10457 (2001)
16. D.Munoz-Torrero, P.Camps. *Curr. Med. Chem.*, **13**, 399–422 (2006)
17. H.Lin, Q.Li, K.Gu, J.Zhu, X.Jiang, Y.Chen, H.Sun. *Curr. Top. Med. Chem.*, **17** (27), 3000–3016 (2017)
18. M.Hieke, J.Ness, R.Steri, M.Dittrich, C.Greiner, O.Werz, K.Baumann, M.Schubert-Zsilavec, S.Weggen, H.Zettl. *J. Med. Chem.*, **53**, 4691–4700 (2010)
19. O.M.Bautista-Aguilera, S.Hagenow, A.Palomino-Antolin, V.Farre-Alins, L.Ismaili, P.L.Joffrin, M.L.Jimeno, O.Soukup, J.Janockova, L.Kalinowsky, E.Protschak, I.Iriepa, I.Moraleda, J.S.Schwed, A.Romero Martinez, F.Lopez-Mucoz, M.Chioua, J.Egea, R.R.Ramsay, J.Marco-Contelles, H.Stark. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **56** (41), 12765–12769 (2017)
20. S.O.Bachurin, E.V.Bovina, A.A.Ustyugov. *Med. Res. Rev.*, **37** (5), 1186–1225 (2017)
21. В.Б.Соколов, Г.Ф.Махаева, А.Ю.Аксиненко, В.В.Григорьев, Е.Ф.Шевцова, С.О.Бачурин. *Изв. АН. Сер. хим.*, **10**, 1821–1831 (2017)
22. R.S.Doody, S.I.Gavrilova, M.Sano, R.G.Thomas, P.S.Aisen, S.O.Bachurin, L.Seely, D.Hung. *Lancet*, **372** (9634), 207–215 (2008)
23. A.T.van der Ven, J.C.Pape, D.Hermann, R.Schloesser, J.Genius, N.Fischer, R.Mößner, N.Scherbaum, J.Wiltfang, D.Rujescu, J.Benninghoff. *J. Alzheimers Dis.*, **57** (2), 531–540 (2017)
24. W.Danysz, C.G.Parsons. *Int. J. Geriatr. Psychiatry*, **18** (Suppl. 1), S23–S32 (2003)
25. A.A.Pieper, S.Xie, E.Capota, S.J.Estill, J.Zhong, J.M.Long, G.L.Becker, P.Huntington, S.E.Goldman, C.H.Shen, M.Capota, J.K.Britt, T.Kotti, K.Ure, D.J.Brat, N.S.Williams, K.S.MacMillan, J.Naidoo, L.Melito, J.Hsieh, J.De Brabander, J.M.Ready. *Cell*, **142** (1), 39–51 (2010)
26. В.Б.Соколов, А.Ю.Аксиненко, Т.А.Епишина, Т.В.Горева. *Журн. общ. химии*, **86** (5), 763–766 (2016)
27. В.Б.Соколов, А.Ю.Аксиненко, Т.А.Епишина, Т.В.Горева. *Журн. общ. химии*, **86** (8), 1827 (2016)
28. В.Б.Соколов, А.Ю.Аксиненко, Т.А.Епишина, Т.В.Горева. *Журн. общ. химии*, **86** (10), 1748–1750 (2016)
29. В.Б.Соколов, А.Ю.Аксиненко, Т.В.Горева, Т.А.Епишина, В.В.Григорьев, А.В.Габрельян, Д.В.Виноградова, Л.Г.Дубова, П.Н.Шевцов, Е.Ф.Шевцова, С.О.Бачурин. *Изв. АН. Сер. хим.*, **5**, 1346–1353 (2016)
30. В.Б.Соколов, А.Ю.Аксиненко, Т.В.Горева, Т.А.Епишина, В.В.Григорьев, А.В.Габрельян, Д.В.Виноградова, М.Е.Неганова, Е.Ф.Шевцова, С.О.Бачурин. *Изв. АН. Сер. хим.*, **5**, 1354–1359 (2016)
31. В.Б.Соколов, А.Ю.Аксиненко, Т.В.Горева, Т.А.Епишина, Л.Г.Дубова, Е.С.Дубровская, С.Г.Клочков, П.Н.Шевцов, Е.Ф.Шевцова, С.О.Бачурин. *Изв. АН. Сер. хим.*, **9**, 2718–2721 (2016)
32. М.Е.Neganova, S.G.Klochkov, S.V.Afanasieva, T.P.Serkova, E.S.Chudinova, S.O.Bachurin, V.P.Reddy, G.Aliev, E.F.Shevtsova. *CNS & Neurological Disorders — Drug Targets*, **15**, 102–107 (2016)
33. А.К.Устинов, И.В.Серков, А.Н.Прошин, Н.В.Ковалева, Н.П.Болтнева, Г.Ф.Махаева, С.О.Бачурин. *Изв. АН. Сер. хим.*, **11**, 2718–2721 (2016)
34. А.А.Ustyugov, E.F.Shevtsova, G.E.Barreto, G.M.Ashraf, S.O.Bachurin, G.Aliev. *Curr. Med. Chem.*, **23**, 1–12 (2016)
35. Г.Ф.Махаева, А.Н.Прошин, Н.П.Болтнева, Е.В.Рудакова, Н.В.Ковалева, О.Г.Серебрякова, И.В.Серков, С.О.Бачурин. *Изв. АН. Сер. хим.*, **6**, 1586–1591 (2016)
36. О.А.Раевский, С.В.Трепалин, В.Ю.Григорьев, А.В.Ярков, С.О.Бачурин. Мультицелевые органические соединения с потенциальным действием на центральную нервную систему. Заявка на регистрацию базы данных, № 12321-9311/551 от 23 сентября 2016 г.
37. S.O.Bachurin, E.F.Shevtsova, G.F.Makhaeva, V.V.Grigoriev, N.P.Boltneva, N.V.Kovaleva, S.V.Lushchekina, P.N.Shevtsov, M.E.Neganova, O.M.Redkozubova, E.V.Bovina, A.V.Gabrelyan, V.P.Fisenko, V.B.Sokolov, A.Yu.Aksinenko, V.Echeverria, G.E.Barreto, G.Aliev. *Sci. Rep.*, **7**, 45627 (2017)
38. G.F.Makhaeva., V.B.Sokolov, E.F.Shevtsova, N.V.Kovaleva, S.V.Lushchekina, N.P.Boltneva, E.V.Rudakova, A.Yu.Aksinenko, P.N.Shevtsov, M.E.Neganova, L.G.Dubova, S.O.Bachurin. *Pure Appl. Chem.*, **89** (8), 1167–1184 (2017)
39. E.F.Shevtsova, D.V.Vinogradova, M.E.Neganova, M.Avila-Rodriguez, G.M.Ashraf, G.E.Barreto, S.O.Bachurin, G.Aliev. *CNS Neurol. Disord. — Drug Targets*, **16** (6), 677–685 (2017)



40. С.О.Бачурин, В. Б.Соколов, А. Ю.Аксиненко, Г.Ф.Махаева, В.В.Григорьев, Н.Н.Нинкина, М.С.Кухарский. Производные фенотиазинсодержащих 1,2,3,4-тетрагидропиридо[4,3-*b*]индолы в качестве средства для снижения неконтролируемой агрегации белков в нервной системе, способы их получения, фармакологическое средство на их основе и способ снижения неконтролируемой агрегации белков в нервной системе. Патент РФ № 2529899 (2014)
41. С.О.Бачурин, В. Б.Соколов, А. Ю.Аксиненко, Г.Ф.Махаева, В.В.Григорьев, Н.Н.Нинкина, М.С.Кухарский. Производные 1,2,3,4-тетрагидропиридо[4,3-*b*]индолсодержащих фенотиазинов в качестве ингибиторов холинэстераз и блокаторов серотониновых рецепторов 5-НТ<sub>6</sub>, способы их получения и фармакологическое средство на их основе. Патент РФ № 2530881 (2014)
42. С.О.Бачурин, В. Б.Соколов, А. Ю.Аксиненко, Т.А.Епишина, Т.В.Горева, Е.Ф.Шевцова, П.Н.Шевцов. Адамантансодержащие индолы и их гидрохлориды, обладающие свойством стабилизации микротрубочек, способ их получения, фармакологическое средство на их основе и способ лечения и предупреждения заболеваний, связанных с нарушениями системы микротрубочек. Патент РФ № 2608631 (2017)
43. С.О.Бачурин, В.Б.Соколов, А.Ю.Аксиненко, Е.Ф.Шевцова, А.Ю.Абрамов, Д.В.Виноградова, М.Е.Неганова. Применение адамантансодержащих индолы и их гидрохлоридов в качестве цитопротекторов и для лечения и предупреждения заболеваний, связанных с увеличением цитозольной концентрации кальция, и фармакологическое средство на их основе. Патент РФ № 2608737 (2017)
44. С.О.Бачурин, Е.Ф.Шевцова, Г.Ф.Махаева, В.Б.Соколов. *Экспер. Фармакол., Приложение*, **26** (2018)
45. С.О.Бачурин, Е.Ф.Шевцова, Г.Ф.Махаева, В.Б.Соколов. Тез. докл., *5 Съезд фармакологов РФ*, Ярославль, 2018; [www.pharm2018.ru/includes/itogi/pharm2018-presentations.zip](http://www.pharm2018.ru/includes/itogi/pharm2018-presentations.zip)

# Генетические модели нейродегенеративных процессов

Н.Н.Нинкина,<sup>1</sup> А.А.Устюгов<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Лаборатория генетического моделирования нейродегенеративных процессов  
ИФАВ РАН

<sup>2</sup> Группа клеточных технологий ИФАВ РАН

При создании болезнь-модифицирующих препаратов для лечения протеинопатий рассматриваются различные аспекты молекулярной патологии, играющие важную роль в развитии и прогрессии заболеваний, относящихся к этой группе. Современные достижения в изучении механизмов повреждения нейронов при протеинопатиях, особенно выявление путей передачи и распространения патологического процесса при спорадических формах, позволило наметить новые направления в стратегии разработки их патогенетической терапии.

Большинство нейродегенеративных заболеваний, включая болезнь Альцгеймера (БА) и болезнь Паркинсона (БП) являются протеинопатиями с агрегацией специфических белков и формированием нерастворимых филаментов. БА характеризуется наличием внеклеточных бляшек, сформированных амилоидными агрегатами бета-амилоидного пептида, а также внутриклеточных включений в нейронах с агрегированным тау-белком [1]. Некоторые, преимущественно наследственные формы БА ассоциированы с мутациями в гене, кодирующем белок-предшественник амилоида (APP), расщепление которого приводит к образованию токсического бета-амилоидного остатка (A $\beta$ 42). В этих случаях дисфункция APP предшествует дисфункции тау.

Напротив, мутации в *MAPT* — гене, кодирующем белок тау, ассоциированы с семейными

формами фронтотемпоральной деменции и паркинсонизма и характеризуются присутствием множественных тау-включений, отсутствием A $\beta$ 42-бляшек и наследуются по аутосомно-доминантному типу. Интересно, что мутации в *APP*, а не *MAPT*, вызывают наследственные формы БА, но при этом для развития патологии необходимо, чтобы одновременно формировались бета-амилоидные отложения и нейрофибриллярные клубки [2]. Наличие многочисленных A $\beta$ 42-бляшек при отсутствии или даже выявлении отдельных нейрофибриллярных клубков не ведет к фенотипу БА. Скрещивание же линий мышей, экспрессирующих мутантный тау, с линиями, экспрессирующими мутантный APP, способствует активации прогрессии патологии, характерной для БА [3]. По-видимому, именно патология тау обеспечивает токсичность, вызванную A $\beta$ 42, и эксайтотоксичность нейронов [4].

Данные по анализу молекулярных патологий при спорадических формах БА позволили сформулировать гипотезу амилоидного каскада, согласно которой агрегация A $\beta$ 42 обуславливает образование тау-включений и последующую синаптическую дисфункцию, гибель нервных клеток и дегенерацию мозга. Согласно последним данным, именно тау включения вызывают нарушения когнитивной функции и установлена прямая корреляция с их множественностью и выраженностью когнитивных расстройств. В соответствии с этой гипотезой A $\beta$ 42 оказывает свое влияние на прогрессию нейродегенерации через тау. В экспериментах со стереотаксическими инъекциями агрегатов мутантного белка тау человека в мозг мышей, трансгенных по немутантному белку тау человека, было показано образование тау-фибрилл, которые затем рас-

**Н.Н.Нинкина.** Доктор медицинских наук, заведующая лабораторией генетического моделирования нейродегенеративных процессов ИФАВ РАН.  
e-mail: natalia\_ninkina@mail.ru

**А.А.Устюгов.** Кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, руководитель группы клеточных технологий ИФАВ РАН. e-mail: alexey@ipac.ac.ru

пространялись в отдаленные области мозга [5]. Более того, инъекции вытяжек из мозга больных с тау-патиями в мозг мышей дикого типа также вызывали агрегацию эндогенного белка тау мышей, образование фибриллярных структур и распространение их в другие отделы мозга [6, 7].

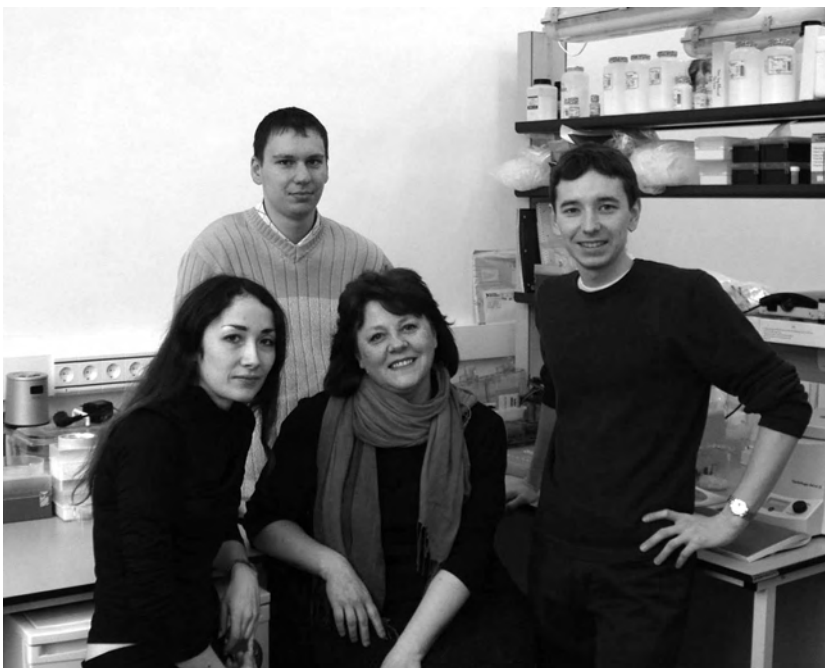
Позднее было показано, что при спорадических формах таупатий распространение патологического процесса может происходить от нейрона к нейрону через синапс [8]. Таким образом, блокировка механизмов переноса патогенных форм тау-белка будет замедлять или даже останавливать прогрессию БА, поэтому поиск фармакологически активных соединений для ингибирования транс-синаптического транспорта тау становится актуальной задачей при создании эффективных методов лечения БА. Транс-синаптическое распространение патологии было установлено и для других форм протеинопатий, например альфа-синуклеинопатии, наблюдаемой при БП [9, 10].

В отличие от БА, для которой характерно присутствие двух типов амилоидных включений, при БП обнаруживается лишь один тип включений — внутриклеточные тельца Леви и нейриты, сформированные белком альфа-синуклеином, которые выявляются в аутопсийном

материале у более чем 95% больных с БП. При доминантно наследуемых формах БП выявлены мутациями в гене *SNCA*, кодирующем белок альфа-синуклеин. Так же, как A $\beta$ 42 и тау, альфа-синуклеин способен изменять конформацию участков белковой молекулы с формированием бета-складчатых структур, агрегировать и инициировать распространение патогенных фибрилл в нервной системе [11, 12]. Тельца Леви были обнаружены в трансплантатах эмбриональных дофаминергических нейронов, пересаженных больным с идиопатической формой БП [13–15]. При пересадке трансгенным мышам в область полосатого тела «здоровых» трансплантатов в них обнаруживается фибриллированный альфа-синуклеин человека, который кодируется трансгенной кассетой реципиента [16]. Данные этих пионерских работ послужили предпосылкой для инициирования в ИФАВ РАН нового направления в разработке патогенетической терапии, которое предполагает поиск методов блокировки механизма передачи амилоидных «затравок» и подавления прогрессии протеинопатии.

Созданная инфраструктура и наличие необходимой коллекции линий генетически модифицированных мышей, моделирующих различные

аспекты протеинопатий, позволили начать такие работы в лаборатории генетического моделирования нейродегенеративных процессов, которая была основана в 2010 году и является одним из самых молодых подразделений ИФАВ РАН. Последние достижения в биомедицинских науках убедительно указывали на необходимость расширения научно-методической базы Института и дополнения ее новыми современными методами и подходами для успешного продолжения исследований по разработке эффективной патогенетической терапии социально значимых заболеваний. В ИФАВ РАН пришли новые сотрудники и новые технологии. Н.Н.Нинкина и



**Рис. 1.** Первый состав лаборатории генетического моделирования нейродегенеративных процессов (слева направо): Т.А.Шелковникова, В.С.Кохан, Н.Н.Нинкина и А.А.Устюгов.

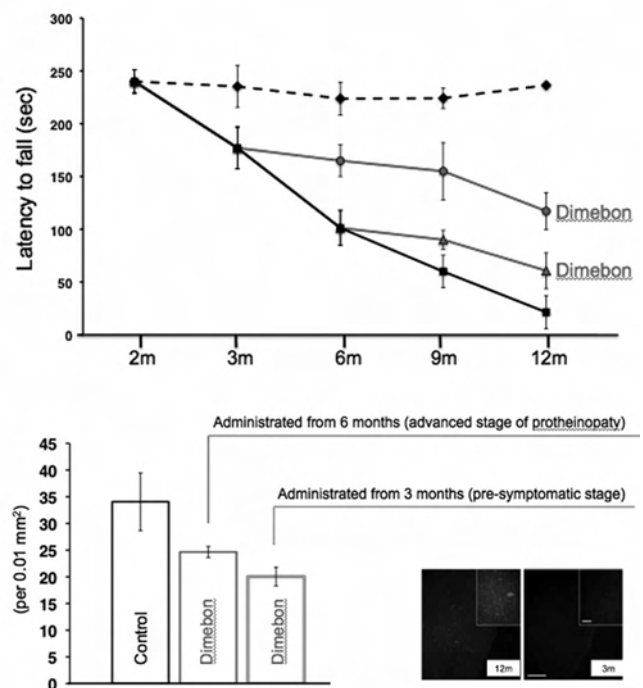
А.А.Устюгов начали создавать современную лабораторию, отвечающую вызовам времени (рис. 1). Так в Институте появились линии генетически модифицированных мышей, воспроизводящих основные звенья патогенеза распространенных нейродегенеративных заболеваний человека, применение которых позволило оптимизировать исследования механизмов действия и отбор новых соединений, синтезируемых в ИФАВ РАН. На базе обновленного, отвечающего современным требованиям Центра по работе с лабораторными животными в беспатогенных условиях расположились лабораторные комплексы для высокотехнологичного фенотипического анализа мышей, патогистологических и молекулярно-биологических исследований. Лаборатория приняла выпускников ведущих учебных заведений, которые активно включились в научную работу по новому направлению, сконцентрированному на изучении протеинопатий — группы прогрессирующих нейродегенеративных заболеваний, в патогенезе которых на первый план выступает нарушение конформации и патогенная агрегация потенциально амилоидогенных белков.

Анализ действия соединений из группы гамма-карболинов, в первую очередь отечественного препарата Димебон на трансгенных моделях, позволил установить их способность замедлять прогрессию протеинопатий. Было показано, что эти препараты являются мультитаргетными и обеспечивают ингибирование патологического процесса путем воздействия на различные собственные внутренние защитные механизмы нейронов. Помимо уже выявленного и хорошо исследованного ранее сотрудниками ИФАВ РАН митопротекторного действия Димебона, было показано, что этот препарат и его производные способны также подавлять формирование патогенных белковых агрегатов в модельных клеточных и животных системах. Кроме того было выявлено важное свойство гамма-карболинов воздействовать на клеточные механизмы активации аутофагосомной системы, обеспечивающие защитную функцию нейронов путем контролируемой деградации пред-сформированных патогенных белковых фибриллярных структур. Более того, был открыт пронейрогенный эффект гамма-карболинов в животных системах, позволяющий активировать

во взрослом мозге образование новых нейронов для замещения утерянных вследствие нейродегенеративных процессов. Результатом такого мультитаргетного действия исследованных соединений явилось существенное замедление прогрессии протеинопатии в трансгенных мышах и развития моделируемого нейродегенеративного заболевания (рис. 2).

Все эти данные, подтвержденные целым рядом ведущих лабораторий, послужили основанием для дальнейшего развития исследований в данном направлении, которые успешно продолжаются. Лаборатория активно сотрудничает с Кардиффским университетом, Университетом Экс-Марсель, Российским национальным исследовательским медицинским университетом им. Н.И.Пирогова, Институтом молекулярной биологии РАН и Институтом биологии гена РАН.

В ИФАВ РАН совместно с коллегами из ИБГ РАН была создана новая, наиболее адекватная на сегодняшний день трансгенная модель бокового амиотрофического склероза — линия мышей, в геноме которых встроена трансгенная кассета, обеспечивающая нейроспецифи-



**Рис. 2.** Многократное введение Димебона трансгенным Thy1m-gammaSN мышам улучшает показатели моторной функции в симптоматической стадии протеинопатии и снижает число амилоидных включений в нейронах передних рогов спинного мозга.

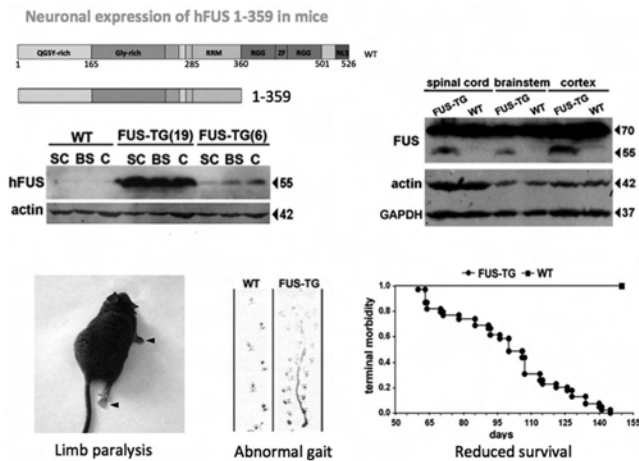


Рис. 3. Получение трансгенной линии FUS[1-359] мышей.

ческую экспрессию патогенной укороченной формы РНК-связывающего белка FUS человека (рис. 3).

Важная роль РНК-связывающих белков TDP-43 и FUS в патогенезе тяжелого нейродегенеративного заболевания — бокового амиотрофического склероза (БАС) была выявлена недавно. Однако доказательства прямого, не опосредованного вовлечения патологии белка FUS в развитие БАС отсутствовали. Такие доказательства были получены после создания нашей линии трансгенных мышей TG-FUS, известной как FUS[1-359]. У мышей линии FUS[1-359] с возрастом развивался фенотип БАС, а при патогистологическом анализе выявлялись признаки прогрессирующей FUS-протеинопатии с формированием характерных FUS-реактивных включений и избирательным поражением двигательных нейронов (рис. 4).

В настоящее время эта линия используется для тестирования новых соединений с целью создания эффективной терапии нейродегенеративных заболеваний, в патогенезе которых на первый план выступает FUS-протеинопатия.

В лаборатории были созданы все условия для проведения экспериментальных работ по исследованию нейродегенеративных процессов с использованием трансгенных мышечных моделей протеинопатий, а коллекция пополнилась классическими линиями, используемыми для изучения болезни Альцгеймера. Кроме того разработана целая батарея нокаутных синуклеиновых линий, позволяющая исследовать патологии, связанные с нарушением дофаминового

обмена, такие как болезнь Паркинсона, деменция с рассеянными тельцами Леви и различные типы патологических зависимостей.

#### Коллекция генетически модифицированных животных включает:

1. Трансгенную лилию Tau<sup>P301S</sup>, характеризующуюся формированием нейрофибриллярных клубков, выявляемых при болезни Альцгеймера.

2. Трансгенную лилию 5xFAD, моделирующую церебральный амилоидоз, обеспечиваемый присутствием в геноме трансгенных мышей последовательности, кодирующей APP белок человека с тремя мутациями, выявляемыми при наследственных формах болезни Альцгеймера, и встроенным в геном этих мышей геном пресенилина человека с двумя мутациями.

3. Трансгенную лилию hFUS(1-359), моделирующую прогрессирующую FUS-протеинопатию, с цитоплазматическими FUS-реактивными включениями в нейронах, выявляемых при ряде форм бокового амиотрофического склероза и фронтотемпоральной дегенерации.

4. Группу нокаутных линий для изучения роли синуклеинов в нарушениях нейротрансмис-

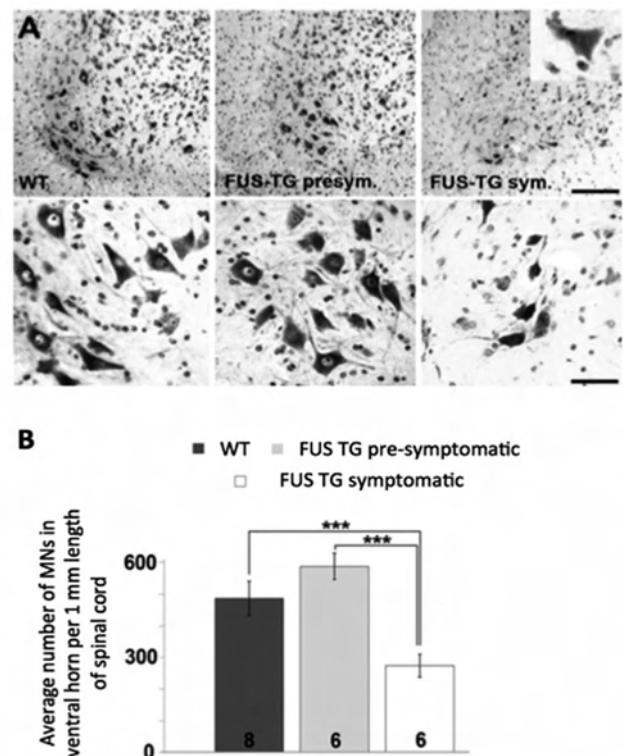


Рис. 4. Селективное поражение двигательных нейронов в спинном мозге FUS[1-359] мышей.

сии при болезни Паркинсона, митохондриальных дисфункциях, нарушениях дофаминового обмена, патологических зависимостей, когнитивных расстройств:

а. alpha-syn-КО [aKO] с делецией гена альфа-синуклеина;

б. beta-syn-КО [bKO] с делецией гена бета-синуклеина;

в. gamma-syn-КО [gKO] с делецией гена гамма-синуклеина;

г. ab-syn-КО [abKO] двойной нокаут с делецией генов альфа-синуклеина и бета-синуклеина;

д. ag-syn-КО [agKO] двойной нокаут с делецией генов альфа-синуклеина и гамма-синуклеина;

е. bg-syn-КО [bgKO] двойной нокаут с делецией генов бета-синуклеина и гамма-синуклеина;

ж. abg-syn-КО [abgKO] тройной нокаут.

5. Регулируемый нокаут гена альфа-синуклеина с геномной модификацией, при которой введены LoxP-сайты для вырезания и генетической инактивации гена альфа-синуклеина с помощью Cre-рекомбиназы.

6. Вспомогательную трансгенную линию ER-NSE-Cre для регулируемой рекомбинации по LoxP-сайтам только в нейронах, поскольку трансгенная кассета регуляторные элементы эстрагенового рецептора для активации Cre-рекомбиназы тамоксифеном содержит под нейроспецифическим Thy-1 промотором.

Все линии генетически модифицированных мышей успешно применяются в научных проектах лаборатории, что позволило обеспечить высокий уровень исследований. Животные из коллекции ИФАВ РАН предоставлены для работы научным лабораториям других институтов РАН и Министерства здравоохранения Российской Федерации.

### Наиболее значимые работы

1. Н.Н.Нинкина, А.А.Устюгов, В.Л.Бухман. *Молекулярная биология*, **42** (5), 840–855 (2008)
2. С.О.Бачурин, А.А.Устюгов, О.Петерс, Т.А.Шелковникова, В.Л.Бухман, Н.Н.Нинкина. *Доклады Академии наук: Биохимия и Биофизика*, **428** (2), 262–265 (2009)
3. S.O.Bachurin, T.A.Shelkovnikova, A.A.Ustyugov, O.Peters, I.Khritankova, M.A.Afanasyeva, T.V.Tarasova, I.I.Alentov, V.L.Buchman, N.Ninkina. *Neurotoxicity Research*, **22** (1), 33–42 (2012)
4. А.А.Устюгов, Т.А.Шелковникова, В.С.Кохан, И.В.Хританкова, О.Петерс, В.Л.Бухман,

- С.О.Бачурин, Н.Н.Нинкина. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*, **152** (12), 675–678 (2011)
5. Т.А.Шелковникова, А.А.Куликова, Ф.О.Цветков, О.Петерс, С.О.Бачурин, В.Л.Бухман, Н.Н.Нинкина. *Молекулярная биология*, **46** (3), 402–415 (2012)
  6. N.Ninkina, O.M.Peters, N.Connor-Robson, O.Lytkina, E.Sharfeddin, V.L.Buchman. *Journal of Biological Chemistry*, **287** (53), 44471–44477 (2012)
  7. T.A.Shelkovnikova, O.M.Peters, A.V.Deykin, N.Connor-Robson, H.Robinson, A.A.Ustyugov, S.O.Bachurin, T.G.Ermolkevich, I.L.Goldman, E.R.Sadchikova, E.A.Kovrazhkina, V.I.Skvortsova, S.Ling, S.Da Cruz, P.A.Parone, V.L.Buchman N.N.Ninkina. *Journal of Biological Chemistry*, **288**, 25266–25274 (2013)
  8. Е.В.Броновицкий, А.В.Дейкин, Т.Г.Ермолкевич, А.Б.Еляков, Е.Н.Фёдоров, Е.Р.Садчикова, И.Л.Гольдман, Р.К.Овчинников, А.Ю.Роман, И.В.Хританкова, М.С.Кухарский, В.Л.Бухман, С.О.Бачурин, А.А.Устюгов *Доклады академии наук*, **462** (5), 609–612 (2015)
  9. M.S.Kukharsky, A.Quintiero, T.Matsumoto, K.Matsukawa, T.Hashimoto, T.Iwatsubo, V.L.Buchman, T.A.Shelkovnikova. *Molecular Neurodegeneration*, **10** (1), 20–25 (2015)
  10. H.K.Robinson, A.V.Deykin, E.V.Bronovitsky, R.K.Ovchinnikov, A.A.Ustyugov, T.A.Shelkovnikova, M.S.Kukharsky, T.G.Ermolkevich, I.L.Goldman, E.R.Sadchikova, E.A.Kovrazhkina, S.O.Bachurin, V.L.Buchman, N.N.Ninkina. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration*, **16** (5–6), 402–409 (2015)
  11. N.Y.Abramychева, E.V.Lysogorskaia, M.S.Stepanova, M.N.Zakharova, E.A.Kovrazhkina, O.D.Razinskaya, A.P.Smirnov, A.V.Maltsev, A.A.Ustyugov, M.S.Kukharsky, I.V.Khritankova, S.O.Bachurin, J.Cooper-Knock, V.L.Buchman, S.N.Illarioshkin, V.I.Skvortsova, N.Ninkina. *Neurobiology of Aging*, **36** (10), 2908–2912 (2015)
  12. N.Ninkina, N.Connor-Robson, A.A.Ustyugov, T.V.Tarasova, T.A.Shelkovnikova, V.L.Buchman. *Scientific Reports*, **13** (5), 16615–16630 (2015)
  13. Т.В.Тарасова, А.А.Устюгов, Н.Н.Нинкина, В.И.Скворцова. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*, **3**, 3–10 (2016)
  14. П.К.Анохин, Т.В.Проскуракова, И.Ю.Шамакина, А.А.Устюгов, С.О.Нейрохимия, **4**, 1–7 (2016)
  15. M.H.Ludtmann, P.R.Angelova, N.N.Ninkina, S.Gandhi, V.L.Buchman, A.Y.Abramov. *Journal of Neurosciences*, **36** (41), 10510–10521 (2016)
  16. A.Y.Roman, G.Limorenko, A.A.Ustyugov, T.V.Tarasova, E.A.Lysikova, V.L.Buchman, N.Ninkina. *Transgenic Research*, **26** (2), 301–307 (2017)
  17. T.A.Shelkovnikova, P.Dimasi, M.S.Kukharsky, A.Quintiero, C.Schirmer, L.Buee, M.C.Galas, V.L.Buchman. *Cell Death and Diseases*, **8** (5), e2788 (2017)
  18. T.V.Tarasova, O.A.Lytkina, V.V.Goloborshcheva, L.N.Skuratovskaya, A.I.Antohin, R.K.Ovchinnikov, M.S.Kukharsky. *PeerJ*, **6**, e4779 (2018)
  19. T.A.Shelkovnikova, M.S.Kukharsky, H.An, P.Dimasi, S.Alexeeva, O.Shabir, P.R.Heath, V.L.Buchman. *Molecular Neurodegeneration*, **13** (1), 30–45 (2018)

## Литература

1. C.L.Masters, D.J.Selkoe. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, **2** (6), a006262 (2012)
2. P.T.Nelson, I.Alafuzoff, E.H.Bigio, C.Bouras, H.Braak, N.J.Cairns, R.J.Castellani, B.J.Crain, P.Davies, K.Del Tredici, C.Duyckaerts, M.P.Frosch, V.Haroutunian, P.R.Hof, C.M.Hulette, B.T.Hyman, T.Iwatsubo, K.A.Jellinger, G.A.Jicha, E.Kovari, W.A.Kukull, J.B.Leverenz, S.Love, I.R.Mackenzie, D.M.Mann, E.Maslah, A.C.McKee, T.J.Montine, J.C.Morris, J.A.Schneider, J.A.Sonnen, D.R.Thal, J.Q.Trojanowski, J.C.Troncoso, T.Wisniewski, R.L.Woltjer, T.G.Beach. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, **71** (5), 362–381 (2012)
3. J.Lewis, D.W.Dickson, W.L.Lin, L.Chisholm, A.Corrall, G.Jones, S.H.Yen, N.Sahara, L.Skipper, D.Yager, C.Eckman, J.Hardy, M.Hutton, E.McGowan. *Science*, **293** (5534), 1487–1491 (2001)
4. E.D.Roberson, K.Scearce-Levie, J.J.Palop, F.Yan, I.H.Cheng, T.Wu, H.Gerstein, G.Q.Yu, L.Mucke. *Science*, **316** (5825), 750–754 (2007)
5. F.Clavaguera, T.Bolmont, R.A.Crowther, D.Abramowski, S.Frank, A.Probst, G.Fraser, A.K.Stalder, M.Beibel, M.Staufenbiel, M.Jucker, M.Goedert, M.Tolnay. *Nature cell biology*, **11** (7), 909–913 (2009)
6. L.Liu, V.Drouet, J.W.Wu, M.P.Witter, S.A.Small, C.Clelland, K.Duff. *PloS one*, **7** (2), e31302 (2012)
7. Z.Ahmed, J.Cooper, T.K.Murray, K.Garn, E.McNaughton, H.Clarke, S.Parhizkar, M.A.Ward, A.Cavallini, S.Jackson, S.Bose, F.Clavaguera, M.Tolnay, I.Lavenir, M.Goedert, M.L.Hutton, M.J.O'Neill. *Acta neuropathologica*, **127** (5), 667–683 (2014)
8. A.de Calignon, M.Polydoro, M.Suarez-Calvet, C.William, D.H.Adamowicz, K.J.Kopeikina, R.Pitstick, N.Sahara, K.H.Ashe, G.A.Carlson, T.L.Spires-Jones, B.T.Hyman. *Neuron*, **73** (4), 685–697 (2012)
9. M.Goedert, B.Falcon, F.Clavaguera, M.Tolnay. *Current neurology and neuroscience reports*, **14** (11), 495 (2014)
10. M.Goedert. *Science*, **349** (6248), 1255555 (2015)
11. T.Nonaka, S.T.Watanabe, T.Iwatsubo, M.Hasegawa. *The Journal of biological chemistry*, **285** (45), 34885–34898 (2010)
12. K.C.Luk, C.Song, P.O'Brien, A.Stieber, J.R.Branch, K.R.Brunden, J.Q.Trojanowski, V.M.Lee. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106** (47), 20051–20056 (2009)
13. C.W.Olanow, S.B.Prusiner. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106** (31), 12571–12572 (2009)
14. J.H.Kordower, Y.Chu, R.A.Hauser, T.B.Freeman, C.W.Olanow. *Nature medicine*, **14** (5), 504–506 (2008)
15. J.Y.Li, E.Englund, J.L.Holton, D.Soulet, P.Hagell, A.J.Lees, T.Lashley, N.P.Quinn, S.Rehncrona, A.Bjorklund, H.Widner, T.Revesz, O.Lindvall, P.Brundin. *Nature medicine*, **14** (5), 501–503 (2008)
16. P.Desplats, H.J.Lee, E.J.Bae, C.Patrick, E.Rockenstein, L.Crews, B.Spencer, E.Maslah, S.J.Lee. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106** (31), 13010–13015 (2009)

# Роль белков фактора AP-1 в нейродегенерации и нейропротекции

Н.А.Маркова, Л.Н.Петрова, Е.Ф.Шевцова

Лаборатория биомолекулярного скрининга ИФАВ РАН

## 1. Введение

Несмотря на многолетнюю историю изучения деменций, до сих пор отсутствует четкое понимание этиологии когнитивных дисфункций, поэтому не разработано эффективной фармакотерапии таких нарушений. Известно, что с возрастом происходит смещение тонкого баланса между процессами гибели нейронов, нейропротекции и нейрогенеза, что и сказывается на снижении когнитивной функции. В этом отношении транскрипционный фактор AP-1 (активирующий протеин-1) представляет большой интерес, поскольку он вовлечен как в процессы пролиферации и дифференциации, так и в процессы гибели клеток [1]. Транскрипционный фактор AP-1 [2], связываясь с определенными участками ДНК и регулируя экспрессию как собственных генов, так и генов других белков [3], играет важную роль в регуляции клеточной пролиферации, дифференциации и гибели [4, 5, 6]. Значит, AP-1 важен для выживания нейронов в одних случаях, но инициирует клеточную гибель в других, поэтому иногда фактор AP-1 даже образно называют судьей, принимающим решение между жизнью и смертью клетки [7].

Фактор AP-1 представляет собой димер белков Fos- и Jun-семейств, чаще всего c-Fos и c-Jun,

реже — FosB, Fra1, Fra2, JunB, JunD. Теоретически возможно более 20 комбинаций этих белков в гетеро- и гомодимерах AP-1 фактора [8], но работы, посвященные изучению функций AP-1 фактора, чаще всего сфокусированы на одном из белков и какой-либо одной из функций. Мы считаем, что для понимания механизмов регуляции функций нервной системы посредством фактора AP-1 важно оценивать двойственность роли белков Fos- и Jun-семейств в процессах нейропластичности и гибели нейронов.

Сопоставляя данные разных исследований, мы склонны полагать, что преобладание в составе AP-1 c-Fos в большей степени отвечает за нейропластичность и выживаемость нейронов, тогда как c-Jun — за апоптоз. Не следует забывать, что чрезмерная активация физиологических стимулов становится патологической, и этим может быть объяснена роль c-Fos также и в гибели нейронов посредством эксайтотоксичности. Тогда изменение белкового состава димеров AP-1 фактора (соотношение c-Fos/c-Jun), меняющееся при старении и(или) при воздействии патологических факторов, может смещать баланс между процессами жизни и смерти нейронов, приводя к нарушению когнитивной пластичности — способности к обучению и адекватному использованию новой информации, подавлению нерелевантных данных. Так, у трансгенных *c-fos*<sup>-/-</sup> мышей наблюдается нарушение индукции долговременной потенциации (LTP) в CA1 области гиппокампа [9], а снижение объема мозга и преждевременная смерть могут объясняться соответствующим увеличением гомодимеров Jun – Jun, что связано с инициацией апоптоза и клеточным репликативным старением [10, 11, 12].

---

**Н.А.Маркова.** Кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории биомолекулярного скрининга ИФАВ РАН.

e-mail: markova\_n.a@list.ru

**Л.Н.Петрова.** Научный сотрудник лаборатории биомолекулярного скрининга ИФАВ РАН.

e-mail: petrova@ipac.ac.ru

**Е.Ф.Шевцова.** Кандидат химических наук, главный научный сотрудник, заведующая лабораторией биомолекулярного скрининга ИФАВ РАН.

e-mail: shevtsova@ipac.ac.ru



## 2. *c-fos*/AP-1 участвует в процессах памяти и обучения

Исторически большая часть исследований роли AP-1 фактора в процессах синаптической пластичности и памяти сосредоточена на *c-Fos* белке и его генной экспрессии. Мы нашли лишь косвенные, и довольно противоречивые, данные относительно роли *c-Jun* в синаптической пластичности. Объектом в этих работах была *c-Jun*-N-терминальная киназа (JNK), которая, фосфорилируя, активирует *c-Jun*. Так, например, в *in vivo* экспериментах было показано, что внутригиппокампальная инъекция ингибитора JNK sp600125 усиливает кратковременную память, но блокирует формирование долговременной памяти [13]. У мышей, успешно обучавшихся в тесте кондиционирования страха, не отмечается изменений мРНК JNK1 [14]. У *Jnk2<sup>-/-</sup>* мышей, нокаутных по одному из генов, кодирующих JNK, LTP снижена [15], но этого нарушения не наблюдается у *Jnk1<sup>-/-</sup>* мышей [16]. Основываясь на представленных данных, можно предположить, что *c-Jun* вовлечена в процессы памяти скорее за счет регуляции долговременной депрессии (LTD), а не LTP. Это подтверждается и электрофизиологическими данными о введении ингибитора JNK D-JNKI, которое способствовало LTD. В свою очередь, усиление LTD косвенно способствует LTP за счет нарушения депотенциации [17]. Анализируя данные относительно роли JNK, стоит помнить, что у киназы есть другие субстраты, в том числе и *c-Fos* [18], поэтому нельзя сделать окончательного вывода об участии *c-Jun* в процессах памяти.

В отличие от *c-Jun*, роль *c-Fos* в процессах синаптической пластичности изучена гораздо лучше. Так, используя разные модели, было показано, что мРНК *c-Fos* экспрессируется в определенных структурах мозга, ответственных за обучение. Например, в гиппокампе хорошо обучившихся в Y-лабиринте крыс содержание мРНК *c-Fos* выросло практически в три раза по сравнению с базовым уровнем [19]. Генная экспрессия *c-Fos* также увеличивается у цыплят после помещения их в обогащенную среду или обучения условному рефлексу пассивного избегания [20].

По-видимому, экспрессия *c-Fos* важна для индукции и/или поддержания NMDA-зависимых

LTP и LTD (NMDA — N-метил-D-аспартат). Это следует из наблюдений, что экспрессия *c-Fos* увеличивается в культуре клеток в течение 30 мин после индукции LTP [20, 21, 22]. У крыс во время обучения гиппокамп-зависимому тесту или при исследовании новой обстановки наблюдается инициация LTD в CA1 зоне гиппокампа и последующая экспрессия мРНК *c-Fos* [21, 23]. Abraham с соавт. [23] отметили, что только сильная стимуляция мозга крыс приводит к LTP, длящейся несколько месяцев, и параллельному увеличению мРНК *c-Fos*. Они предположили, что *c-Fos* белок способствует стабилизации LTP. Следует отметить, что в данных условиях увеличилась и генная экспрессия *c-Jun* белка [24].

Также показано, что блокирование индукции мРНК и белка *c-Fos* в гиппокампе снижает LTP и способность к обучению. Например, один из механизмов амнестического эффекта скопол-амина, который широко используется в качестве модели нарушений памяти [12, 25, 26, 27, 28], связан с ингибированием экспрессии мРНК *c-Fos* и *GluN2B* (NR2B по старой номенклатуре) субъединицы NMDA-рецепторов [29, 30]. Введение МК-801 — неконкурентного антагониста NMDA-рецепторов — помимо нарушения LTP и снижения способности к обучению также снижает накопление белка *c-Fos* в нейронах зубчатой фасции гиппокампа [31, 32].

Механизмы, через которые глутамат активирует *c-fos* в нейронах, достаточно хорошо описаны. Одни из них реализуются благодаря CaMKIV (кальций/кальмодулин-зависимая протеинкиназа) [33] и/или через кальций-зависимое фосфорилирование транскрипционного фактора CREB с помощью ERK (ERK — экстраклеточно-регулируемая протеинкиназа) [34]. Так, в культивированных гиппокампальных или корковых нейронах доминантно-отрицательный ингибитор CREB полностью предотвращал индукцию *c-fos* глутаматом.

Сигналы цитозольного кальция также могут активировать транскрипцию *c-fos* через SRE (ответного элемента сыворотки) [35]. Фосфорилирование транскрипционного фактора Elk1, приводящее к SRE-зависимой транскрипции *c-fos*, было продемонстрировано в коре и стриатуме крыс после активации NMDA-рецепторов [33, 36]. Это подтверждено в работе Lerea с со-

авт. [37]. Авторами было показано, что входа кальция через NMDA-рецептор достаточно для активации SRE в промоторе *c-fos* и регистрации транскрипции *c-Fos* в трансфицированных клетках [37, 38].

В то же время рост ядерной  $[Ca^{2+}]$  вызывает снижение транскрипции *c-fos*, реализуемое через нижестоящий регуляторный элемент (DRE), который связывает кальций-связывающий белок и вызывает антагонистическую модуляцию DRE-транскрипционного репрессора (DREAM) [33].

Чрезмерная активация NMDA-рецепторов приводит к тому, что вход ионов  $Ca^{2+}$  становится достаточно сильным, чтобы способствовать кальциевой перегрузке, дисфункции митохондрий и эксайтотоксичности. Причем возможно, субъединичная композиция рецептора может определять это процесс. Так, было высказано предположение, что эксайтотоксичность инициируется селективной активацией NMDAR, содержащих субъединицу GluN2B [39] и, возможно, GluN6 [8]. С возрастом субъединичный состав NMDA-рецепторов и механизмы гомеостаза кальция в мозге меняются [40], что, очевидно, запускает каскад реакций, ведущих к гибели клеток, в которых участвует и *c-Fos*.

Помимо участия в NMDA-зависимых процессах синаптической пластичности, *c-Fos*, вероятно, вовлечен в процессы взрослого нейрогенеза [41]. После помещения в обогащенную среду [42, 43] или обучения в водном лабиринте Морриса [44] у мышей увеличивается общее количество новых нейронов и экспрессия *c-Fos* в этих новых нейронах зубчатой фасции гиппокампа. Это указывает на то, что *c-Fos* экспрессируется при рождении нейронов и впоследствии может способствовать их выживаемости [42]. Напротив, с возрастом наблюдается снижение нейрогенеза на фоне снижения иммунореактивности *c-Fos* в зубчатой фасции гиппокампа. У 6–7-месячных мышей линии J20, модели болезни Альцгеймера, уровень белка *c-Fos* в гиппокампе коррелирует со сниженной способностью к обучению в водном лабиринте Морриса [45]. При сравнении мышей линии C57Bl/6 в возрасте 3, 11 и 23 месяцев также наблюдается возраст-зависимое нарушение памяти, коррелирующее со снижением белка *c-Fos* в зубчатой фасции и с синаптической пластичностью [46].

Все данные вместе предполагают возрастное снижение экспрессии *c-Fos* белка, что связано с нарушением нейрогенеза и LTP, что может объяснить когнитивные дисфункции в позднем возрасте.

### 3. Роль *c-Jun* и *c-Fos* в процессах клеточной гибели и нейропротекции

Комплексу AP-1 отводится большая роль не только в развитии нейронов, но и в их гибели, казалось бы, в противоположном первом процессе. Считается, что существуют по меньшей мере два сценария, по которым экспрессия белков *c-Jun* и *c-Fos* может привести к апоптозу [47]. Во-первых, эти генные продукты стимулируют постмитотические нейроны к повторному входу в клеточный цикл. Действительно, апоптоз и клеточный цикл в течение некоторого времени имеют схожие пути развития [48], а белки *Jun* и *Fos* семейств индуцируются как во время апоптоза нейронов, так и при повторном включении клеточного цикла в фибробластах. Второй сценарий включает окислительный стресс. Накопление активных форм кислорода (ROS) оказывает влияние на такие параметры митохондрий как поглощение кальция, производство АТФ, мембранный потенциал, митохондриальная проницаемость, которые приводят к повреждению нейронов [49]. С окислительным стрессом тесно связана и сигнализация митоген-активированных протеинкиназ (MAPKs), регулирующих широкий спектр генов, участвующих в клеточных ответах. Три группы подсемейств MAPK включают ERK, JNK и p53-MAPK [34]. Динамический баланс между активацией этих киназ определяет клеточный ответ — рост или гибель клеток [50]. В свою очередь, активация указанных белковых семейств тесно связана с активацией *c-Jun* и/или *c-Fos*. Как говорилось ранее, ERK/CREB путь активирует *c-fos* промотор [34]. JNK фосфорилирует *c-Jun*, что является важным фактором для активации *c-Jun/AP-1* фактора [51]. p38-MAPK могут связываться с *c-Fos* и фосфорилировать его трансактивационный домен, что усиливает экспрессию *c-fos* [52].

Роль *c-Jun* в процессах апоптоза, кажется, не вызывает сомнений. После активации MAPK фосфорилированный JNK транслоцируется в ядро, где фосфорилирует и активирует *c-Jun*

[51]. Фосфорилирование c-Jun приводит к образованию AP-1 фактора и транскрипции ряда белков, известных проапоптотическими свойствами, таких как TNF-а (фактор некроза опухоли), Fas-L (Fas-лиганд) и белок Bax [53]. Было замечено, что активация c-Jun необходима для апоптоза нейронов центральной нервной системы — ингибирование ядерного JNK предотвращает апоптоз [54], животные с мутантным, нефосфорилируемым, c-Jun отличаются устойчивостью к апоптозу в ответ на облучение ультрафиолетом [55].

В отличие от c-Jun, данные о причастности c-Fos к апоптотическим процессам более противоречивы. С одной стороны, введение 3-нитропропионовой кислоты, ингибитора сукцинатдегидрогеназы, приводит к окислительному стрессу, увеличению экспрессии *c-fos* и инициации апоптоза в мозге мышей, что подтверждает роль белка в апоптозе клеток [7]. Возможна связь между c-Fos и бета-амилоидом (A $\beta$ ) в процессах нарушения функций митохондрий с последующим апоптозом клеток. На культуре клеток эндотелия мозга мышей (SECs) показано, что введение A $\beta$ <sub>25-35</sub> приводит к быстрой активации AP-1 и последующей экспрессии *Vim*, представителя семейства проапоптотических белков ВНЗ. При этом ингибирование AP-1 с помощью антисмыслового олигонуклеотида c-Fos снижает экспрессию *Vim*. Эти результаты свидетельствуют о том, что апоптотический каскад, активированный A $\beta$ , включает активацию c-Fos/AP-1 фактора с последующей индукцией *Vim*, что приводит к гибели SECs [56].

Данные о причастности c-Fos к апоптотическим процессам плохо согласуются с тем фактом, что у трансгенных мышей отсутствие экспрессии *c-fos* приводит к усиленной гибели клеток в мозге [7]. В этом отношении интересные результаты получены коллаборацией Ness и Zhang. Авторы сообщают, что хотя у 7-дневных мышей, подверженных модели гипоксии, генная экспрессия c-Fos в течение 3 часов увеличивается в 40 раз, а иммунореактивность c-Fos по времени предшествует активации каспазы-3 в некоторых областях гиппокампа, но все же иммунореактивность c-Fos была наибольшей в тех областях, где было больше нейронов, устойчивых к гипоксии [57]. Также трехнедельные мыши

с подавленной экспрессией *c-fos* в гиппокампе демонстрируют повышенную гибель нейронов в ответ на введение каиново́й кислоты [58]. На основе этих данных авторы делают заключение о нейропротекторной функции c-Fos.

Наряду с этим есть ряд исследований, указывающих на влияние c-Fos в митохондриальном биогенезе. Показано, что ингибиторы ERK и p38 устраняют когнитивный дефицит, вызванный введением A $\beta$  за счет индукции биогенеза митохондрий, увеличения фосфорилирования CREB и активации *c-fos* [34, 59, 60].

Имеются данные о нейропротекторной роли и других белков AP-1 фактора. Так, например, Fra-2-IR сохранялся в нейронах, выживших при ишемическом повреждении [8]. В работе Sommer [61] отмечена селективная индукция c-Jun в выживших нейронах CA1, которые в противном случае погибают при отсутствии c-Jun. Выраженная экспрессия c-Jun наблюдается в успешно регенерирующих нейронах [62] и после перерезки спинного мозга [63].

#### 4. Заключение

Мы склонны полагать, что c-Jun главным образом вовлечен в AP-1-зависимые апоптотические процессы, а наблюдаемое увеличение мРНК и белка c-Fos в моделях апоптоза может быть компенсаторным, направленным на нейропротекцию после повреждения. Отсюда предполагаем, что соотношение белков Fos и Jun семейств в димерах AP-1 фактора может определять вклад транскрипционного фактора в про- или антиапоптотические процессы. Мы считаем, что лучшее понимание возрастной и патологической изменчивости роли AP-1 фактора решало бы не только фундаментальную задачу, но и способствовало бы индивидуальному подбору превентивной или лечебной терапии когнитивных нарушений различной этиологии.

#### Литература

1. E. Shaulian, M. Karin, *Oncogene*, **20**, 2390–2400 (2001)
2. A. Fleischmann, O. Hvalby, V. Jensen, T. Strekalova, C. Zacher, L. E. Layer, A. Kvello, M. Reschke, R. Spanagel, R. Sprengel, E. F. Wagner, P. Gass. *Journal of Neuroscience*, **23** (27), 9116–9122 (2003)
3. L. Kaczmarek, E. Nikolajew. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, **50** (4–5), 173–179 (1990)
4. R. Müller, T. Curran, D. Müller, L. Guilbert. *Nature*, **314** (6011), 546–548 (1985)

5. R.J.Smeyne, M.Vendrell, M.Hayward, S.J.Baker, G.G.Miao, K.Schilling, L.M.Robertson, T.Curran, J.I.Morgan. *Nature*, **363** (6425), 166–169 (1993)
6. C.Zhang, H.Wu, X.Zhu, Y.Wang, J.Guo. *Reviews in the Neurosciences*, **22** (4), 457–465 (2011)
7. M.Ameyar, M.Wisniewska, J.B.Weitzman. *Biochimie*, **85** (8), 747–752 (2003)
8. T.Herdegen, V.Waetzig. *Oncogene*, **20**, 2424–2437 (2001)
9. F.N.Velazquez, B.L.Caputto, F.D.Boussin. *Aging*, **7** (12), 1028–1029 (2015)
10. J.Irving, J.Feng, C.Wistrom, M.Pikaart, B.Villeponteau. *Experimental Cell Research*, **202** (1), 161–166 (1992)
11. F.N.Velazquez, C.G.Prucca, O.Etienne, D.S.D.Astolfo, D.C.Silvestre, F.D.Boussin, B.L.Caputto. *Oncotarget*, **6** (19), 16883–16901 (2015)
12. Y.Wu, X.Luo, X.Liu, D.Liu, X.Wang, Z.Guo, L.Zhu, Q.Tian, X.Yang, J.Z.Wang. *Scientific Reports*, **5**, 15032 (2015)
13. L.R.M.Bevilaqua, D.S.Kerr, J.N.Medina, I.Izquierdo, M.Cammarota. *The European Journal of Neuroscience*, **17** (4), 897–902 (2003)
14. W.Haeusgen, R.Boehm, Y.Zhao, T.Herdegen, V.Waetzig. *Neuroscience*, **161** (4), 951–959 (2009)
15. X.M.Li, C.C.Li, S.S.Yu, J.T.Chen, K.Sabapathy, D.Y.Ruan. *European Journal of Neuroscience*, **25** (2), 391–396(2007)
16. J.T.Chen, D.H.Lu, C.P.Chia, C.P., D.Y.Ruan, K.Sabapathy, Z.C.Xiao. *Journal of Neurochemistry*, **93** (2), 463–473 (2005)
17. H.Yang, M.J.Courtney, P.Martinsson, D.Manahan-Vaughan. *European Journal of Neuroscience*, **33** (9), 1647–1655 (2011)
18. T.Sherrin, T.Black, C.Todorovic. *Reviews in the Neurosciences*, **22** (4), 403–410 (2011)
19. W.Tischmeyer, L.Kaczmarek, M.Strauss, R.Jork, H.Matthies. *Behavioral and Neural Biology*, **54** (2), 165–171 (1990)
20. M.Dragunow. *Behavior Genetics*, **26** (3), 293–299 (1996).
21. A.Kemp, W.Tischmeyer, D.Manahan-Vaughan. *Behavioural Brain Research*, **254**, 83–91 (2013)
22. K.Minatohara, M.Akiyoshi, H.Okuno. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, **8**, 1–11 (2016)
23. W.C.Abraham, B.R.Christie, B.Logan, P.Lawlor, M.Dragunow. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **91** (21), 10049–10053 (1994)
24. W.C.Abraham, S.E.Mason, J.Demmer, J.M.Williams,C.L.Richardson, W.P.Tate, P.A.Lawlor M.Dragunow. *Neuroscience*, **56** (3), 717–727(1993)
25. R.Bajo, S.Pusil, M.E.López, L.Canuet, E.Pereda, D.Osipova, F.Maestú, E.Pekkonen. *Scientific Reports*, **5**, 9748 (2015)
26. L.-M.Balmus, A.Ciobica. *American Journal of Alzheimer s Disease and Other Dementias*, **32** (7), 418–428 (2017)
27. H.Y.Kim, E.J.Shin, B.H.Lee, S.H.Choi, S.W.Jung, I.H.Cho, S.H.Hwang, J.Y.Kim, J.S.Han, C.Chung, C.G.Jang, H.Rhim, H.C.Kim, S.Y.Nah. *Molecules and Cells*, **38** (9), 796–805 (2015)
28. J.Y.Seo, S.S.Lim, J.Kim, K.W.Lee, J.-S.Kim. *Phytotherapy Research*, **31** (5), 801–811 (2017)
29. N.Guo, G.S.Robertson, H.C.Fibiger. *Brain Research*, **588** (1), 164–167 (1992)
30. C.Lu, L.Dong, J.Lv, Y.Wang, B.Fan, F.Wang, X.Liu. *Chemico-Biological Interactions*, **279**, 64–72 (2018)
31. L.Korshunova, M.D.Gjørnlund, S.Owczarek, A.V.Petersen, J.-F.Perrier, C.R.Göttsche, V.Berezin. *Pharmacology Research & Perspectives*, **3** (2) e00126 (2015)
32. F.R.Sharp, J.Liu, J.Nickolenko, B.Bontempi. *Behavioural Brain Research*, **66** (1–2), 225–230 (1995)
33. J.F.Harrison, M.L.Rinne, M.R.Kelley, N.M.Druzhyna, G.L.Wilson, S.P.Ledoux. *Glia*, **55** (14), 1416–1425 (2007)
34. G.Ashabi, M.Ramin, P.Azizi, Z.Taslami, S.Z.Alamdary, A.Haghpars, N.Ansari, F.Motamedi, F.Khodagholi. *Behavioural Brain Research*, **232** (1), 165–173 (2012)
35. G.Hardingham, S.Chawla, C.Johnson, H.Bading. *Nature*, **385** (6613), 260–265 (1997)
36. P.Vanhoutte, J.V.Barnier, B.Guibert, C.Pagnis, M.J.Besson, R.A.Hipskind, J.Caboche. *Molecular and Cellular Biology*, **19** (1), 136–146 (1999)
37. L.S.Lerea, L.S.Butler, J.O.McNamara. *The Journal of Neuroscience*, **12** (8), 2973–2981 (1992)
38. Z.Xia, H.Dudek, C.K.Miranti, M.E.Greenberg. *The Journal of Neuroscience*, **16** (17), 5425–5436 (1996)
39. R.L.Stanika, N.B.Pivovarova, C.A.Brantner, C.A.Watts, C.A.Winters, S.B.Andrews. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **106** (24), 9854–9859 (2009)
40. B.L.Brim, R.Haskell, R.Awedikian, N.M.Ellinwood, L.Jin, A.Kumar, T.C.Foster, K.R.Magnusson. *Behavioural Brain Research*, **238** (1), 211–226 (2013)
41. Y.W.Tsai, Y.R.Yang, P.S.Wang, R.Y.Wang. *PLoS ONE*, **6** (8), e24001 (2011)
42. P.J.Clark, R.A.Kohman, D.S.Miller, T.K.Bhattacharya, E.H.Haferkamp, J.S.Rhodes. *Behavioural Brain Research*, **213** (2), 246–252 (2010)
43. A.Tashiro, H.Makino, F.H.Gage. *Journal of Neuroscience*, **27** (12), 3252–3259 (2007)
44. J.S.Snyder, R.Radik, J.M.Wojtowicz, H.A.Cameron. *Hippocampus*, **19** (4), 360–370 (2009)
45. J.J.Palop, B.Jones, L.Kekoni, J.Chin, G.-Q.Yu, J.Raber, J., E.Masliyah, L.Mucke. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100** (16), 9572–9577 (2003)
46. M.Weber, T.Wu, J.E.Hanson, N.M.Alam, H.Solanoy, H.Ngu, B.E.Lauffer, H.H.Lin, S.L.Dominguez, J.Reeder, J.Tom, P.Steiner, O.Foreman, G.T.Prusky, K.Scarce-Levie. *eNeuro*, **2** (5), 1–26 (2015)
47. S.Estus, W.J.Zaks. *The Journal of Cell Biology*, **127** (6), 1717–1727 (1994)
48. D.Ucker. *The New Biologist*, **3** (2), 103–109 (1991)
49. J.Hroudová, N.Singh, Z.Fisar. *BioMed Research International*, Article ID 175062, 9 pages (2014)
50. Z.Assefa, A.Vantiegghem, W.Declercq, P.Vandenabeele, J.R.Vandenheede, W.Merlevede, P.de Witte, P.Agostinis. *The Journal of Biological Chemistry*, **274** (13), 8788–96 (1999)
51. L.Li, Z.Feng, A.G.Porter. *Journal of Biological Chemistry*, **279** (6), 4058–4065 (2004)
52. T.Tanos, M.J.Marinissen, F.C.Leskow, D.Hochbaum, H.Martinetto, J.S.Gutkind, O.A.Coso. *Journal of Biological Chemistry*, **280** (19), 18842–18852 (2005)
53. M.Fan, T.C.Chambers. *Drug Resistance Updates*, **4** (4), 253–267 (2001)

54. B.Björkblom, J.C.Vainio, V.Hongisto, T.Herdegen, M.J.Courtney, E.T.Coffey. *Journal of Biological Chemistry*, **283** (28), 19704–19713 (2008)
55. D.N.Dhanasekaran, E.P.Reddy. *Oncogene*, **27** (48), 6245–6251 (2008)
56. K.J.Yin, J.M.Lee, S.D.Chen, J.Xu, C.Y.Hsu. *Journal of Neuroscience*, **22** (22), 9764–9770 (2002)
57. J.M.Ness, C.R.Harvey, J.D.Washington, K.A.Roth, S.L.Carroll, J.Zhang. *Journal of Neuroscience Research*, **86** (5), 1115–1124 (2008)
58. J.Zhang, D.Zhang, J.S.McQuade, M.Behbehani, J.Z.Tsien, M.Xu. *Nature Genetics*, **30** (4), 416–420 (2002)
59. A.Picca, A.M.S.Lezza. *Mitochondrion*, **25**, 67–75 (2015)
60. K.Vercauteren, R.A.Pasko, N.Gleyzer, V.M.Marino, R.C.Scarpulla. *Molecular and Cellular Biology*, **26** (20), 7409–7419 (2006)
61. C.Sommer, P.Gass, M. Kiessling. *Brain Pathology*, **5** (2), 135–144 (1995)
62. E.Vaudano, G.Campbell, S.Hunt, A.Lieberman. *The European journal of Neuroscience*, **10** (8), 2644–2656 (1998)
63. J.Houle, J.Ye. *Neuroscience*, **94** (3), 929–936 (1999)

# Гибридные молекулы на основе природного алкалоида секуринина в качестве потенциальных нейропротекторов

М.Е.Неганова,<sup>1</sup> Е.Ф.Шевцова,<sup>1</sup> С.Г.Клочков<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Лаборатория биомолекулярного скрининга ИФАВ РАН

<sup>2</sup> Лаборатория природных соединений ИФАВ РАН

Секуринин, основной алкалоид корня растения Секуринега полукустарниковая (*Securinega suffruticosa* (Pall.) Rehder), обладает выраженной биологической активностью и клинически использовался в нескольких странах [1]. Впервые его действие на ЦНС было показано в 1956 году [2] и с этого времени секуринин применялся в медицинской практике как нейростимулирующий лекарственный препарат [3].

Секуринин является селективными антагонистом GABA рецепторов [4]. Было показано, что секуринин может использоваться при лечении таких неврологических заболеваний, как боковой амиотрофический склероз [5] и рассеянный склероз [6, 7]. Кроме того, было показано, что секуринин является агонистом макрофагов, усиливающим бактериальный клиренс с помощью механизма, отличного от плацебоподобных рецепторов (TLRs) [8]. Секуринин, по видимому, стимулирует фосфорилирование p38 MAPK посредством антагонизма ГАМК<sub>A</sub> рецептора в моноцитах [9]. Было обнаружено, что секуринин стимулирует апоптоз в клетках рака толстой кишки с нокаутом белка p53 [10, 11].

В работе [12] показана перспективность использования секуринина в качестве противовоспалительного средства при лечении болезни

Паркинсона. Секуринин ингибирует активацию воспалительного медиатора NF-κB, а также его активатора MAPK, включая ERK. Кроме того, секуринин подавляет экспрессию iNOS и продуцирование NO, оба этих процесса активируются NF-κB. Так же секуринин оказывает нейропротекторное действие на первичные дофаминергические нейроны в *in vitro* модели болезни Паркинсона, ингибируя липополисахарид-индуцированную микроглиальную активацию.

Lin с соавт. [13] описывают секуринин как потенциальный нейропротектор для лечения болезни Альцгеймера (БА). Хроническое введение D-секуринина, предотвращало проявление когнитивных нарушений у крыс, вызванных введением амилоидного фрагмента (Aβ<sub>25–35</sub>). Так же для D-секуринина характерно снижение ацетилхолинэстеразной (AChE) активности и отсутствие влияния на ацетилтрансферазную (ChAT). Более того D-секуринин способен значительно снижать воспалительный ответ в глиальных клетках, вызванный действием в амилоидного белка.

Димерные аналоги секуринина (с разной длиной углеродной цепи линкера между двумя молекулами секуринина в положении C(15)) показали заметное положительное влияние как на дифференцировку нейронов, так и на расширение нейритной сети нейронных клеток. Действие данных соединений на рост нейритов происходило за счет фосфорилирования – активации нескольких сигнальных молекул, включая Ca<sup>2+</sup>-кальмодулин-зависимую протеинкиназу II (CaMKII), внеклеточную сигнально-регулируемую киназу (ERK) и Akt [14].

Секуринин (**1**) представляет собой соединение с уникальным строением, сочетающим

---

**М.Е.Неганова.** Кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биомолекулярного скрининга ИФАВ РАН. e-mail: neganova83@mail.ru

**Е.Ф.Шевцова.** Кандидат биологических наук, главный научный сотрудник, заведующая лабораторией биомолекулярного скрининга ИФАВ РАН.

e-mail: shevtsova@ipac.ac.ru

**С.Г.Клочков.** Кандидат биологических наук, главный научный сотрудник, заведующий лабораторией природных соединений. e-mail: klochkov@ipac.ac.ru

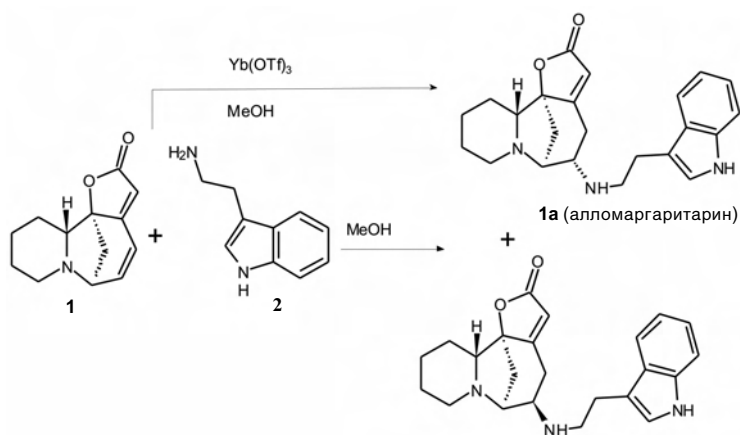


Рис. 1. Схема стереоспецифического синтеза алломаргаритарина.

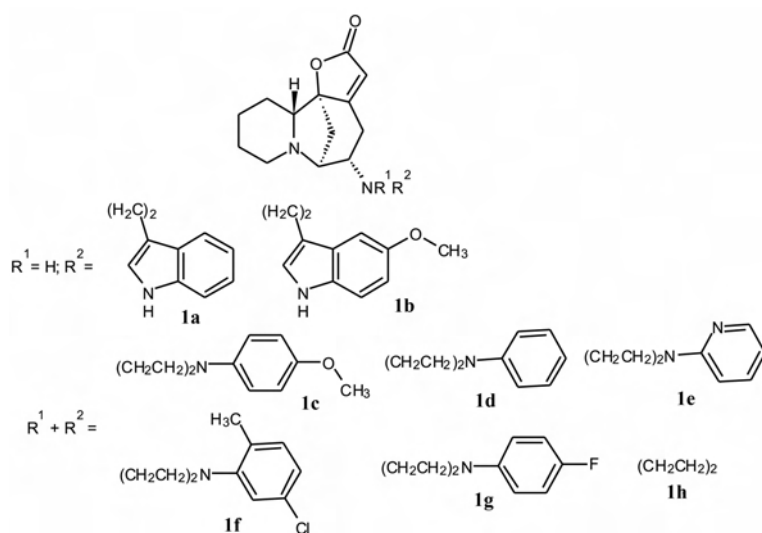


Рис. 2. Схема получения аминопроизводных секуринина.

четыре цикла: 6-азобикало[3.2.1]октан в качестве ключевой структуры, к которой аннелированы  $\alpha,\beta$ -ненасыщенный- $\gamma$ -лактон и пиперидиновое кольцо, и является жесткой молекулой. Среди большого разнообразия минорных секуриновых алкалоидов наиболее интересным представляется минорный алкалоид маргаритарин, выделяемый из растения *Margaritaria indica* Dalz. [15]. Маргаритарин — единственный природный алкалоид секуринового типа, который содержит в качестве периферийного заместителя N-триптаминный фрагмент. Замена кратной связи на  $sp^3$ -гибридизованные атомы углерода и наличие дополнительного асимметрического центра приводит к определенной конформационной подвижности молекулы маргаритарина, в связи с чем увеличивается возможность

ее взаимодействия с активными центрами рецепторов. Маргаритарин является минорным компонентом в смесях алкалоидов и труднодоступен в количествах, достаточных для его исследования. Введение в молекулу секуринина фрагментов, приводящих к конформационной подвижности, представляется перспективным направлением для разработки нейропротекторных препаратов на его основе. В связи с этим основной задачей данного исследования являлась разработка доступных методов синтеза производных секуринина, включая маргаритарин, и исследовать их нейропротекторные свойства.

Наибольший интерес в плане получения модифицированных производных секуринина представляет система сопряженных двойных связей азобикалооктанового и лактонного колец. Поскольку эта система активирована карбонильной группой, она легко подвергается атаке нуклеофилов. В результате нуклеофильного присоединения аминов к секурину могут быть получены гибридные молекулы, содержащие фрагмент алкалоида секуринина и различных фармакофорных аминов.

Нами разработан метод стереоспецифического синтеза алломаргаритарина (**1a**) из соединений **1** и **2** с использованием трифлата иттербия в качестве катализатора (рис. 1).

По аналогичной схеме был получен ряд продуктов аминирования секуринина различными фармакофорными аминами (рис. 2).

Структуры полученных соединений, в том числе конфигурацию нового асимметрического центра при атоме C(9), устанавливали на основании данных спектроскопии ЯМР с привлечением двумерных экспериментов (COSY, HSQC, NOESY). Строение синтезированных соединений было подтверждено методом PCA [16].

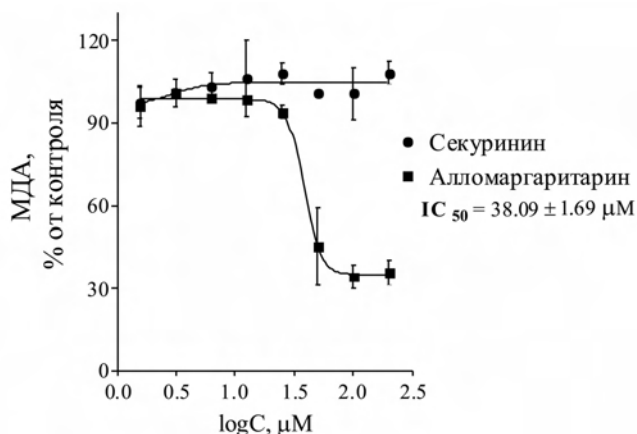
Было проведено комплексное исследование нейропротекторных свойств гибридных молекул, содержащих фрагмент алкалоида секуринина и различных фармакофорных аминов.

**Таблица 1.** Влияние производных секуринина на ПОЛ гомогената мозга крыс, индуцированное  $Fe^{3+}$  и трет-бутилгидроксипероксидом, а также их  $Fe^{2+}$ -хелатирующая и антирадикальная активность.

Соединение	Ингибирование ПОЛ, %		$Fe^{2+}$ -хелатирующая активность, $XA_{Fe}$ , %	Антирадикальная активность (ДФПГ-тест), I, %
	$Fe^{3+}$ -индуцированное	t-БГП-индуцированное		
<b>1</b>	—	—	—	—
<b>1a</b>	86.6 ± 4.5	19.2 ± 4.8	49.3 ± 3.7	12.0 ± 0.5
<b>1b</b>	88.3 ± 0,9	13.25 ± 5.9	53.0 ± 1.8	—
<b>1c</b>	прооксидант	прооксидант	—	—
<b>1d</b>	—	—	—	—
<b>1e</b>	69.1 ± 5.7	—	8.2 ± 0.9	53.6 ± 0.4

**Примечание.** Концентрация соединений 100  $\mu M$ , прочерк означает, что соответствующая активность в условиях эксперимента не обнаружена.

Известно, что окислительный стресс и митохондриальная дисфункция являются важными патогенетическими механизмами в развитии нейродегенеративных заболеваний человека. При изучении биологических свойств полученных аминопроизводных был проведен скрининг по их влиянию на процесс пероксидного окисления липидов в гомогенатах мозга крыс. В работе [17] показано, что исходный алкалоид секуринин не влияет на процесс перекисного окисления липидов (ПОЛ) (табл. 1), а конъюгат секуринина с 4-(4-метоксифенил)пиперазином **1в** проявляет прооксидантную активность, увеличивая ПОЛ, индуцированное ионами  $Fe^{3+}$ , на 57.8%. В то же время, в данном ряду полученных синтетических конъюгатов выявлены соединения **1a**, **1b**, **1e**,



**Рис. 3.** Концентрационная зависимость влияния секуринина и алломаргаритарина на ПОЛ гомогената мозга крыс, индуцированное ионами  $Fe^{3+}$ .

эффективно подавляющие  $Fe^{3+}$ -индуцированное ПОЛ (см. табл. 1). При этом наибольшей активностью, обладали конъюгаты на основе триптамина (**1a,b**) (рис. 3). По-видимому, значительную роль в антиоксидантном эффекте последних играет железо-хелатирующая активность.

При изучении влияния конъюгатов секуринина и аминов на функциональные характеристики митохондрий, было показано, что среди изученных веществ наибольший интерес представляет триптаминоый

аддукт секуринина (алломаргаритарин) [18].

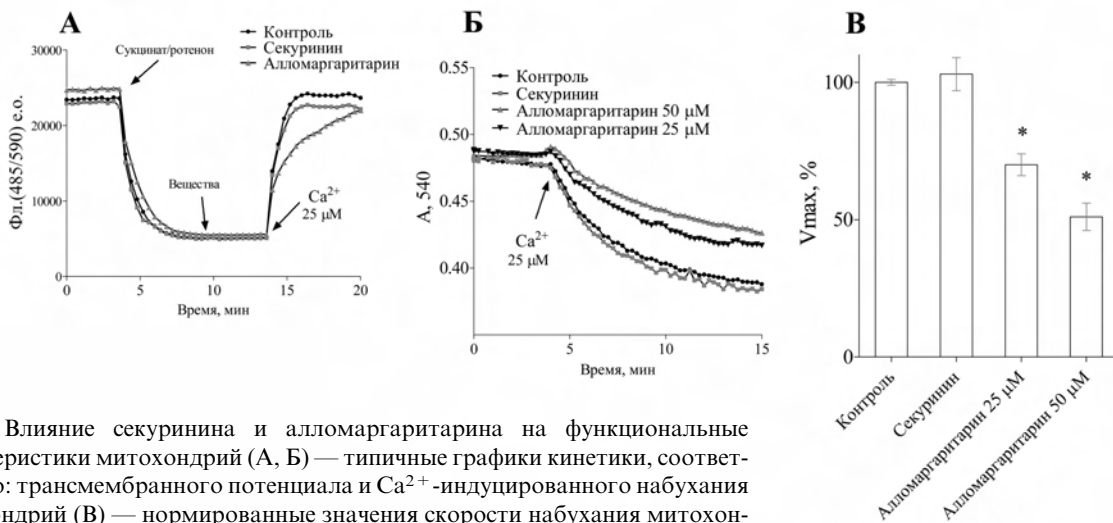
Как видно из рис. 4, алломаргаритарин: не оказывает влияния на трансмембранный потенциал митохондрий в присутствии субстратов дыхательной цепи (см. рис. 4А) и дозозависимо ингибирует  $Ca^{2+}$ -вызванное «набухание» митохондрий мозга крыс (см. рис. 4Б, В). Таким образом, алломаргаритарин проявляет выраженные митопротекторные свойства.

Известно, что  $A\beta$  потенцирует  $Ca^{2+}$ -индуцируемое открытие митохондриальной поры в изолированных митохондриях печени и мозга крыс. Преинкубация изолированных митохондрий мозга крыс с алломаргаритарином приводит к эффективному подавлению  $A\beta$ -( $Ca^{2+}$ )-вызванной индукции открытия поры (рис. 5).

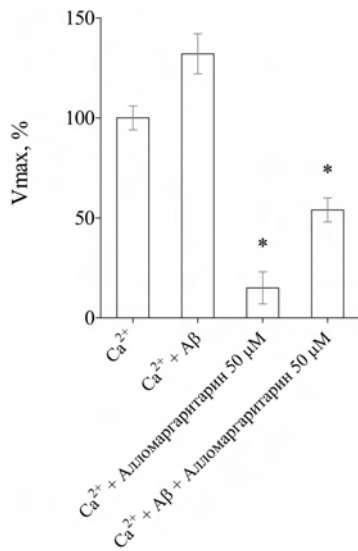
Алломаргаритарин, обладающий антиоксидантным действием эффективно и концентрационно ингибирует агрегацию  $\beta$ -амилоида 1–42 в течение 24-часовой инкубации при 37°C (рис. 6А,Б). Секуринин, который не обладает антиоксидантными свойствами, ингибирующей активностью по отношению к агрегации  $\beta$ -амилоида не обладает (рис. 6А) [19].

Было проведено изучение нейропротекторных свойств алломаргаритарина при различных видах клеточной нейротоксичности (глутаматная токсичность, железо-индуцированная токсичность и  $A\beta$ -индуцированная токсичность). Было показано, что инкубация клеток коры мозга крыс с 25  $\mu M$  алломаргаритарина после воздействия токсикантов значительно увеличивает процент выживших клеток, в отличие от





**Рис. 4.** Влияние секурина и алломаргаритрина на функциональные характеристики митохондрий (А, Б) — типичные графики кинетики, соответственно: трансмембранного потенциала и  $Ca^{2+}$ -индуцированного набухания митохондрий (В) — нормированные значения скорости набухания митохондрий.

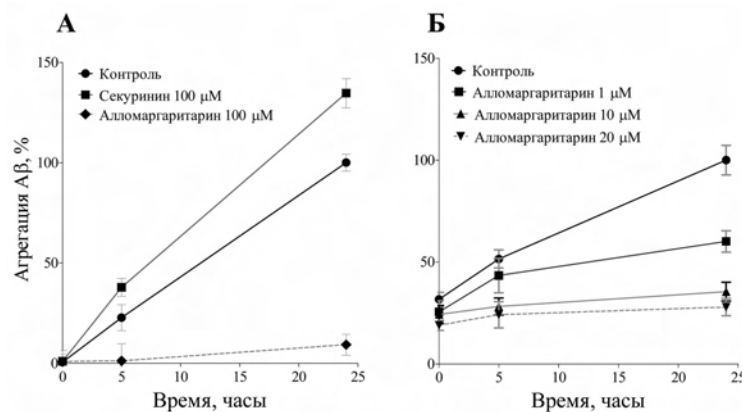


**Рис. 5.** Влияние алломаргаритрина на  $A\beta$ -( $Ca^{2+}$ )-индуцируемое «набухание» митохондрий.

точной нейротоксичности и в основе его защитного действия лежат митопротекторные и антиоксидантные свойства. Данная гибридная молекула на основании полученных данных может рассматриваться как потенциальный нейропротекторный препарат.

Было проведено изучение действия алломаргаритрина *in vivo* с целью выявления токсических эффектов. Вещество вводилось животным (мышам) внутривенно в разных концентрациях (максимально  $800 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1}$ ). Патологических изменений в поведении и физическом состоянии животных при этом не наблюдалось. Введение эквивалентного объема растворителя также не вело к каким-либо изменениям. Оценивали также влияние алломаргаритрина на поведенческие характеристики животных — тест «открытое поле», темно-белая камера, подвешив-

секурина (рис. 7). Этот эффект может быть связан как с антиоксидантным эффектом алломаргаритрина, так и с его способностью увеличивать устойчивость митохондрий к индукции скачка митохондриальной проницаемости [20]. Таким образом, алломаргаритрин эффективно защищает клетки коры мозга крыс при различных видах кле-



**Рис. 6.** Влияние тестируемых соединений ( $100 \mu\text{M}$ ) на агрегацию  $\beta$ -амилоида 1–42 ( $A\beta$ ) (А). Концентрационная зависимость антиагрегации  $A\beta$  алломаргаритрином (Б).

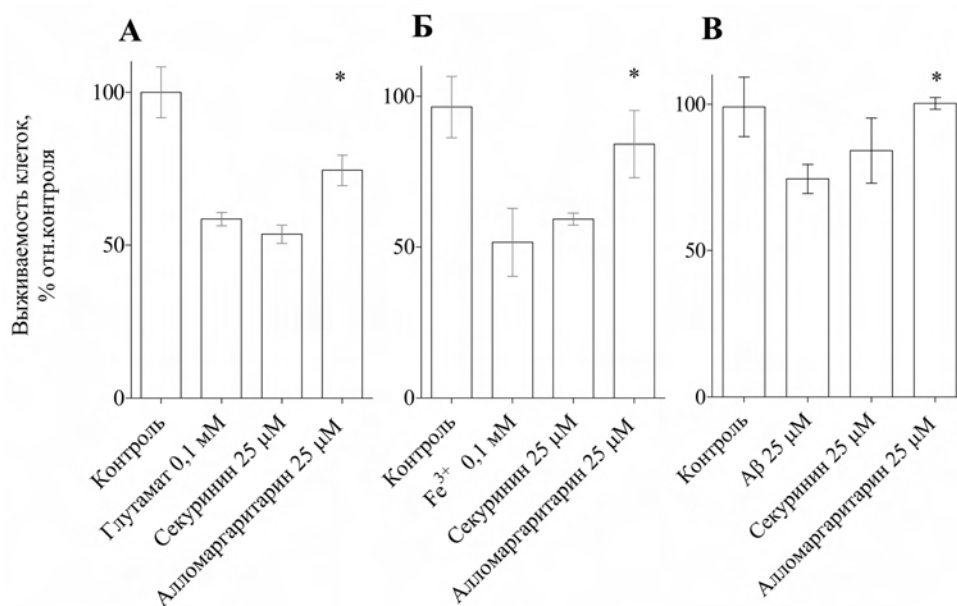


Рис. 7. Влияние секуринина и алломаргаритарина на выживаемость нейронов при различных моделях нейротоксичности. (\* —  $p < 0.05$ , T-test).

вание за хвост. Как показали эксперименты, достоверных отличий от поведения контрольных животных не было. Только в тесте «Гексеналовый сон» при введении алломаргаритарина продолжительность сна достоверно уменьшалась, что может свидетельствовать о связи его действия с ГАМК-эргической системой или индукцией цитохромов печени P450 (рис. 8).

Известно, что секуринин является антагонистом ГАМК<sub>A</sub> рецепторов и применялся как нейростимулирующий агент при лечении различ-

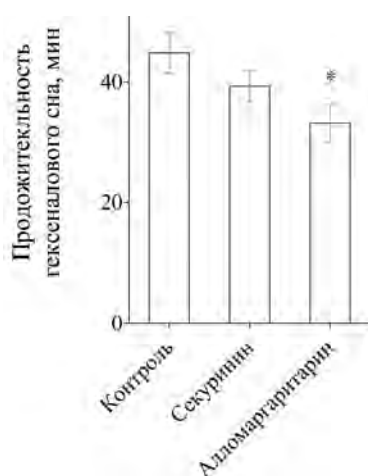


Рис. 8. Влияние секуринина ( $10 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1}$ ) и алломаргаритарина ( $20 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1}$ ) на продолжительность гексеналового сна у мышей. \* —  $p < 0.05$  (Mann-Whitney U Test). Количество животных в группах = 10.

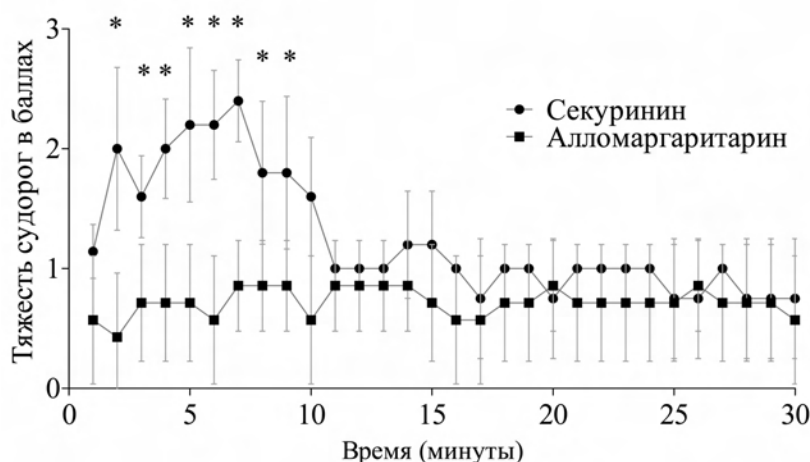
ных заболеваний, в частности, бокового амиотрофического склероза. Но с воздействием на эту же мишень связано и его нежелательное побочное действие — просудорожный эффект. В связи с этим была исследована возможность возникновения просудорожного эффекта триптаминового аддукта секуринина с целью поиска путей дальнейшей оптимизации структуры.

Введение секуринина мышам в дозе  $20 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1}$  приводило к развитию сильных судорог. Из усредненной динамики развития судорожной активности видно, что тяжесть судорог нарастала практически сразу (рис. 9). При введении алломаргаритарина в дозе  $20 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1}$  судорог не наблюдалось, состояние мышей характеризовалось нулевой или 1-й стадией. У контрольных мышей, которым вводили растворитель, отклонений в поведении не наблюдалось. Таким образом, алломаргаритарин, в отличие от секуринина, не обладает просудорожной активностью.

При исследовании влияния разового введения алломаргаритарина мышам на развитие судорог в пентилентетразоловой модели эпилепсии выявлено, что динамика развития судорог у мышей контрольной и опытных групп была сходной. Однако, длительное введение алломаргаритарина ( $5 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1}$  в течение 10 сут), приводило к уменьшению латентного периода развития ПТЗ-индуцированных судорог 3-й стадии, но не влияло на их суммарную длительность (рис. 10) [21].

В литий-пилокарпиновой модели эпилептического статуса алломаргаритарин так же увеличивает латентный период возникновения судорог, но не влияет на их длительность (рис. 11).

Таким образом, на основе уникального природного алкалоида секуринина был разработан стереоспецифический синтез гибридных молекул,



**Рис. 9.** Усредненная динамика развития судорог при введении секуринина ( $n = 6$ ) и алломаргаритарина ( $n = 6$ ) в дозе  $20 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1}$ . \* —  $p < 0.05$  (Mann–Whitney U Test).

содержащих в качестве дополнительного фармакофора различные амины. Полученные молекулы аминоконъюгатов обладают большей конформационной подвижностью, что обеспечивает наличие более выраженной нейропротекторной активности. Среди исследованных соединений выявлено соединение-лидер — алломаргаритарин. По результатам проведенных исследований алломаргаритарин обладает антиоксидантной и митопротекторной активностями, эффективно защищает клетки коры мозга крыс при различных видах клеточной нейроток-

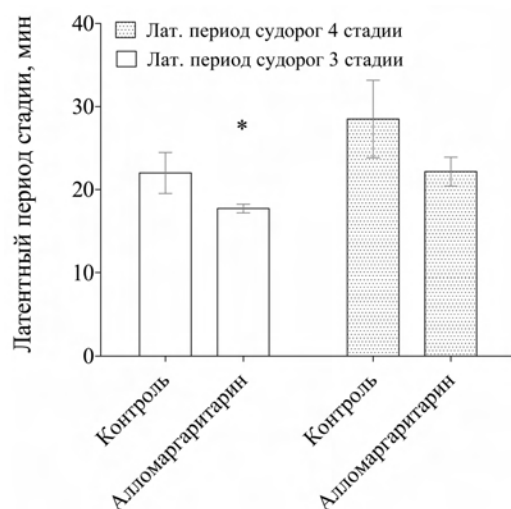
сичности, в том числе при Аβ-индуцированной токсичности.

Также алломаргаритарин эффективно и концентрационно ингибирует агрегацию β-амилоида 1–42 и обладает определенными противосудорожными свойствами. Все это дает основание утверждать, что на основе гибридной молекулы, содержащей два фармакофора — алкалоида секуринина и триптамина, может быть разработан эффективный препарат с нейропротекторными свойствами.

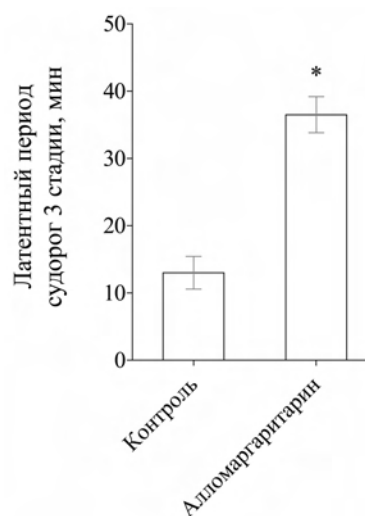
Работа выполнена в рамках Госзадания 0090-2017-0019 и при финансовой поддержке проекта

## Литература

1. E.Chirkin, W.Atkatlian, and F.-H.Porée. *Alkaloids: Chemistry and Biology*, **74**, 1–120 (2015)
2. I.A.Leshkina, A.D.Turova, I.Farmakol. *Toksikol.*, **19**, 11–17 (1956)
3. М.Д.Машковский. *Лекарственные средства*. Ч. 1, Медицина, Москва, С. 161 (1993)
4. S.G.Klochkov, S.V.Afanas'eva, V.V.Grigor'ev. *Chemistry of Natural Compounds*, **44** (2), 197–202 (2008)
5. R.Copperman, G.Copperman, A.Der Marderosian. *Pennsylvania Med.*, **76**, 36–41 (1973)



**Рис. 10.** Различия латентных периодов 3-й и 4-й стадий ПТЗ-вызванных судорог при курсовом введении алломаргаритарина по  $5 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1}$  в течение 10 дней ( $n = 7$ ) или растворителя ( $n = 7$ ). \* —  $p < 0.05$  (Mann–Whitney U Test).



**Рис. 11.** Различия средних латентных периодов 3-й стадии в литийпилокарпиновой модели эпилептического статуса в контроле ( $n = 6$ ) и при введении алломаргаритарина  $20 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1}$  ( $n = 6$ ). \* —  $p < 0.05$  (Mann–Whitney U Test).

6. J.A.Beutler, E.W.Karbon, A.N.Brubaker, R.Malik, D.R.Curtis, and S.J.Enna. *Brain Research*, **330** (1), 135–140 (1985)
7. G.R.Buravtseva. *Farmakologia I Toksikologia*, **21** (5), 7–12 (1958)
8. K.Lubick, M.Radke, M.Jutila. *Journal of Leukocyte Biology*, **82** (5), 1062–1069 (2007)
9. M.Shipman, K.Lubick, D.Fouchard, R.Guram, P.Grieco, M.Jutila, E.A.Dratz. *PLoS ONE*, **7** (9), e41278 (2012)
10. H.Perry, C.Holmes. *Nature Reviews Neurology*, **10** (4), 217–224 (2014)
11. S.Rana, K.Gupta, J.Gomez, S.Matsuyama, A.Chakrabarti, M.L.Agarwal, A.Agarwal, M.K.Agarwal, D.N.Wald. *FASEB Journal*, **24** (6), 2126–2134 (2010)
12. D.Leonoudakis, A.Rane, S.Angeli, G.J.Lithgow, J.K.Andersen, and S.J.Chinta. *Mediators of Inflammation*. doi: 10.1155/2017/8302636. (2017)
13. X.Lin, Z.Jun-Tian. *Neurol. Res.*, **26** (7), 792–796 (2004)
14. G.Tang, X.Liu, N.Ma, X.Huang, Z.L.Wu, W.Zhang, Y.Wang, B.X.Zhao, Z.Y.Wang, F.C.Ip, N.Y.Ip, W.C.Ye, L.Shi, W.M.Chen. *ACS Chem Neurosci.*, **7** (10), 1442–1451 (2016)
15. D.Arbain, A.A.Girkbeck, L.T.Byrne, M.V.Sargent, B.W.Skelton, A.H.White. *J. Chem. Soc.*, **8**, 1863–1869 (1991)
16. S.G.Klochkov, E.Kh.Lermontova, E.S.Chudinova, S.V.Afanasieva. *Chemistry of Natural Compounds*, **50** (3), 583–584 (2014)
17. M.E.Neganova, S.V.Afanas'eva, S.G.Klochkov, E.F.Shevtsova. *Bull. Exp. Biol. Med.*, **152** (6), 720–722 (2012)
18. M.E.Neganova, S.G.Klochkov, S.V.Afanasieva, T.P.Serkova, E.S.Chudinova, S.O.Bachurin, V.P.Reddy, G.Aliev, E.F.Shevtsova. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets*, **15** (1), 102–107 (2016)
19. M.E.Neganova, S.G.Klochkov, L.N.Petrova, E.Shevtsova, S.V.Afanasieva, E.S.Chudinova, V.P.Fisenko, S.O.Bachurin, G.E.Barreto, G.Aliev. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets*, **16**, 351–355 (2017)
20. M.E.Neganova, S.G.Klochkov, S.V.Afanasieva, E.S.Chudinova, T.P.Serkova, E.F.Shevtsova. *Eur. Neuropsychopharmacol.*, **24** (2), 262 (2014)
21. М.Е.Неганова, В.А.Блик, С.Г.Клочков, Н.Е.Чепурнова, Е.Ф.Шевцова. *Нейрохимия*, **28** (3), 236–243 (2011)

## Влияние наружного кальция на интегральные токи в мембране клеток Пуркинье мозжечка крыс

В.Л. Замойский, В.В. Григорьев

*Лаборатория нейрорецепции ИФАВ РАН*

Роль ионов кальция в регуляции как нормального функционирования нейронов ЦНС, так и при патологических состояниях, хотя и широко изучена, тем не менее остается актуальным предметом для исследования. Было показано, что при ряде патологических процессов, таких как ишемия, гипоксия, эпилептический статус, инсульты, происходит значительное, иногда достаточно длительное увеличение внешнего кальция [1]. Это приводит к существенному входу ионов кальция в нейроны и соответствующему увеличению внутриклеточной концентрации кальция,  $Ca_i$ , которое запускает ряд процессов, приводящих в итоге к гибели нейрона. Однако при этом высокие концентрации кальция могут действовать и на другие объекты: пресинаптические окончания, нейрональные рецепторы и ионные каналы соседних нейронов, например, в пенумбре, которые также вносят свой вклад в общую картину патогенеза того или иного заболевания.

Целью данной работы было исследование влияния высоких концентраций кальция с наружной стороны мембраны на интегральные ионные токи одиночных изолированных нейронов Пуркинье.

Исследования осуществляли электрофизиологическим методом на свежесекционированных нейронах Пуркинье из мозжечка (12–15 сут) мозга крыс самцов линии Вистар. Выделение единичных нейронов проводили ферментно-механическим способом [2]. Трансмембранные токи

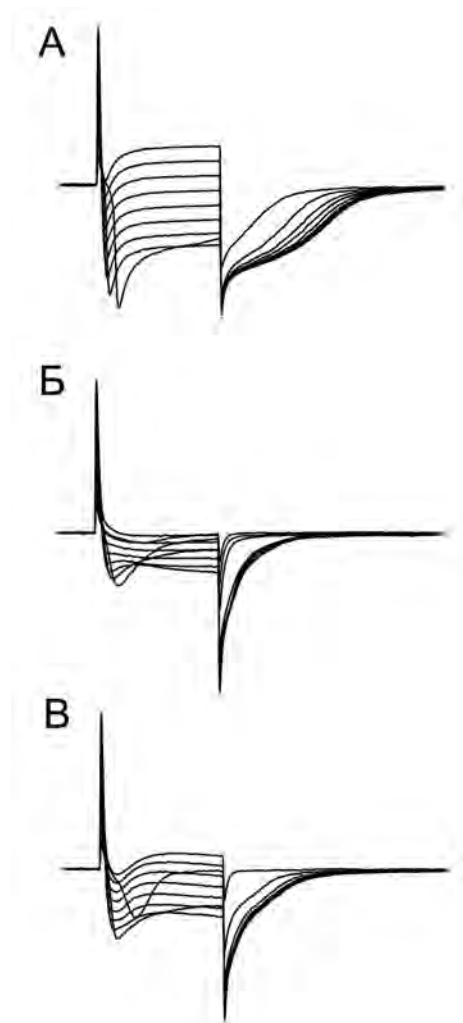
отдельных нервных клеток регистрировали методом локальной фиксации потенциала (patch-clamp) в конфигурации whole-cell с помощью прибора ЕРС-9 (НЕКА, Германия) [3]. Данные обрабатывали при помощи программы Pulsfit (НЕКА, Германия).

При замене раствора внутри микропипетки с хлорида калия (120 мМ) на хлорид цезия (120 мМ) в интегральных токах от целой клетки в ответ на серию деполяризующих импульсов можно регистрировать входящие натриевые токи, выходящие катионные токи, переносимые как через селективные калиевые каналы, так и через низкоселективные катионные каналы, а также выходящие хлорные токи, как это ранее было показано нами (рис. 1А). [4]. При подаче того же внешнего раствора с NaCl 140 мМ, но с увеличенным содержанием ионов  $Ca_2^+$  (5 мМ) наблюдалась следующая картина: амплитуда натриевых токов существенно снижалась, так же, как и амплитуда выходящих катионных токов. Амплитуда хлорных токов практически не уменьшалась, но уменьшалась интегральная площадь хлорного тока, что свидетельствует о существенном уменьшении переносимого заряда ионами хлора (рис 1Б). После отмывки нормальным физиологическим раствором происходило частичное восстановление амплитуд входящего натриевого и выходящего катионного токов, а также увеличение «площади» хлорного тока.

Ранее нами было показано, что амплитуда и длительность кальций-зависимого хлорного тока существенно возрастают при замене нормального наружного раствора на безнатриевый раствор [5]. На рис. 2 показаны ответы клетки в безнатриевом контроле, при увеличенной концентрации  $Ca^{2+}$  (10 мМ) и отмывке безнатриевым раствором.

**В.В.Григорьев.** Доктор биологических наук, заведующий лабораторией нейрорецепции ИФАВ РАН.  
e-mail: grigor@ipac.ac.ru

**В.Л.Замойский.** Кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник той же лаборатории.  
e-mail: vzam@yandex.ru



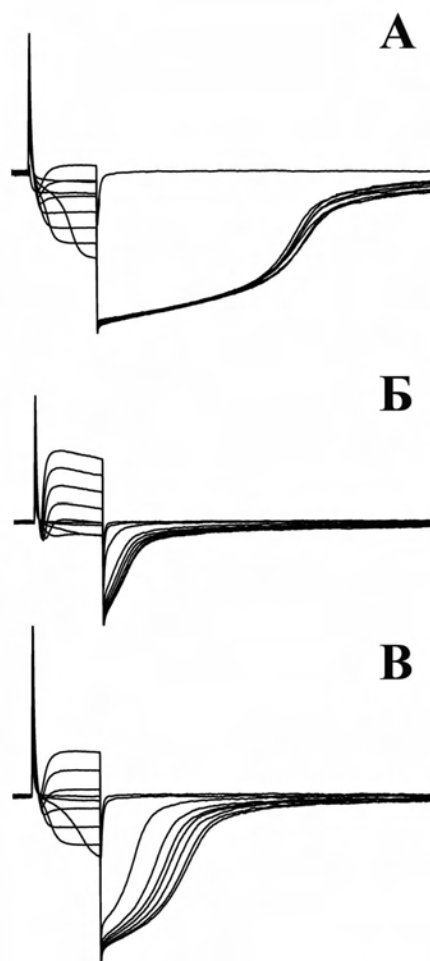
**Рис. 1.** Влияние 5 мМ внешнего кальция на интегральные токи нейрона Пуркинье мозжечка крыс в физиологическом растворе. Примечание: внутриклеточный раствор содержит 120 мМ цезия. А- контроль, Б- при действии 5 мМ кальция, В – отмывка.

Из рис. 2 видно, что существенным образом уменьшен кальций-зависимый хлорный ток. Натриевый ток отсутствует, а катионный ток даже вырос по сравнению с контролем. Можно предположить, что это произошло вследствие уменьшения хлорного тока, который в обычных условиях значительно уменьшал амплитуду катионного тока, поскольку он начинается не после окончания импульса, но практически сразу после его начала (кривые внутри импульса). Ввиду его большой амплитуды и длительности в данных экспериментальных условиях (цезий в пипетке, безнатриевый внешний раствор) влияние его на амплитуду катионного тока весьма значительно.

Отмывка привела к частичному восстановлению хлорного тока и, как следствие, к уменьшению амплитуды катионного тока.

Механизм блокады хлорного тока высокой концентрацией наружного кальция пока неясен. В то же время, вклад кальций-зависимого хлорного тока в механизмы возбуждения и торможения нейрона, как показывают последние исследования, может быть весьма значительным [6].

Также пока неясным остается механизм уменьшения натриевого и катионных токов высокими концентрациями кальция. Это требует проведения дополнительных исследований. Тем не менее, полученные результаты впервые демонстрируют блокирующее действие высоких кон-



**Рис. 2.** Влияние 10 мМ внешнего кальция на интегральные токи нейрона Пуркинье мозжечка крыс в безнатриевом растворе. Примечание: внутриклеточный раствор содержит 120 мМ цезия. А - контроль, Б- при действии 10 мМ кальция, В – отмывка.

центраций внешнего кальция на натриевые, катионные и кальций-зависимые хлорные токи в нейронах Пуркинье.

Таким образом, в представленной работе убедительно показано, что увеличение наружной концентрации ионов кальция до 5–10 мМ существенным образом влияет на потенциалозависимые (и кальций-зависимые) интегральные токи в нейронах Пуркинье. Подобные изменения могут приводить к изменению работы  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -насоса, возбудимости мембраны нейронов, их способности к адекватным ответам на входящую синаптическую передачу, формированию выходящего сигнала. Такие изменения должны учитываться в современных моделях, рассматривающих механизм некроза и апоптоза нейронов и связанных с этим патологических процессов.

Работа выполнена в рамках Государственного задания ИФАВ РАН на 2017–2019 гг. по

теме: «Поиск и исследование механизмов действия нейропротекторов и стимуляторов когнитивных функций», номер государственной регистрации 0120.0504027. В работе использовано оборудование ЦКП ИФАВ РАН (Соглашение № 14.621.21.0008, идентификатор работ RFMEFI62114X0008).

### Литература

1. R.J.DeLorenzo, D.A.Suna, L.S.Deshpande. *Pharmacol. Ther.*, **105** (3), 229–298 (2005)
2. M.Kaneda, H.Nakamura, N.Akaike. *Neurosci. Res.*, **5**, 299–315 (1988)
3. O.P.Hamill, A.Marty, E.Neher, B.Sakmann, F.J.Sigworth. *Pflugers Arch.*, **391**, 85–100 (1981)
4. Е.А.Вихарева, В.Л.Замойский, В.В.Григорьев, С.О.Бачурин. *Доклады Академии наук*, **465** (3), 372–374 (2015)
5. В.Л.Замойский, Е.А.Вихарева, В.В.Григорьев, С.О.Бачурин. *Доклады Академии наук*, **470** (3), 347–349 (2016)
6. W.C.Huang, S.Xiao, F.Huang, B.D.Harfe, L.Y.Jan. *Neuron*, **12** (74), 179–192 (2012)

# Сериновые эстеразы как мишени действия физиологически активных веществ

Г.Ф.Махаева

*Лаборатория молекулярной токсикологии ИФАВ РАН*

## 1. Введение

Сериновые гидролазы — один из самых больших и разнообразных классов ферментов, обнаруженных у эукариот и прокариот. Характерной особенностью сериновых гидролаз является наличие серинового нуклеофила в активном центре. Из 240 сериновых гидролаз, обнаруженных у человека, примерно половину составляют сериновые протеазы, а остальные выполняют метаболические функции. Метаболические сериновые гидролазы включают различные липазы, пептидазы, эстеразы, тиоэстеразы и амидазы. Большинство (более 60%) метаболических сериновых гидролаз относятся к семейству  $\alpha/\beta$ -гидролаз и имеют каталитическую триаду Ser-His-Asp. Поскольку эти ферменты выполняют важные физиологические функции и их механизмы действия достаточно хорошо исследованы и понятны, они являются популярными мишенями для создания лекарств [1, 2].

Ацетилхолинэстераза (АХЭ, КФ 3.1.1.7) является метаболической сериновой гидролазой, которая катализирует гидролиз ацетилхолина, тем самым регулируя холинергическую нейротрансмиссию. При заболеваниях, таких как болезнь Альцгеймера (БА), где наблюдается снижение холинергической активности, ингибирование АХЭ было использовано для лечения ряда симптомов, связанных со сниженным уровнем ацетилхолина [3]. Первый препарат, одобренный для лечения БА — такрин и большинство доступных в настоящее время на рынке лекарств (Донепезил, Ривастигмин и Галантамин), пред-

назначенных для лечения БА, являются ингибиторами холинэстераз [4, 5].

Холинергическая терапия БА изначально была направлена на воздействие на ацетилхолинэстеразу, так как данный фермент является основным для расщепления ацетилхолина в мозге. Исследования последних лет показали, что бутирилхолинэстераза (БХЭ, КФ 3.1.1.8) также участвует в холинергической передаче и способна компенсировать некоторые функции АХЭ, оптимизируя холинергическую нейротрансмиссию [6–9]. В здоровом мозге ацетилхолин преимущественно (80%) гидролизуется АХЭ, тогда как БХЭ играет вспомогательную роль. Однако по мере прогрессирования БА активность АХЭ снижается, в то время как активность БХЭ постепенно увеличивается [8, 10]. В связи с этим возрастает роль БХЭ как терапевтической мишени для снижения наблюдаемого при БА холинергического дефицита [7, 11–13]. Селективные ингибиторы БХЭ, как показали исследования последних лет, повышают уровень ацетилхолина в мозге и улучшают когнитивные функции у грызунов, не оказывая при этом классических побочных эффектов ингибиторов АХЭ [7, 12]. В связи с этим создание селективных ингибиторов БХЭ представляет собой новую стратегию улучшения качества жизни больных БА, особенно на поздних стадиях [8, 10, 13, 14].

В последние годы резко возрос интерес к другой группе метаболических гидролаз, карбоксилэстеразам (КЭ, ЕС 3.1.1.1). КЭ играют важную роль в активации, детоксикации и биораспределении ксенобиотиков, в том числе многочисленных лекарственных препаратов со сложнэфирными, амидными или карбаматными группами, являясь ферментами фазы I метаболизма таких соединений [15, 16]. Возросший интерес к этим ферментам обусловлен в



значительной степени широким использованием концепции этерифицированных пролекарств для улучшения абсорбции и биодоступности фармакологически активных молекул [15], а также информацией о том, что генетический полиморфизм, различные заболевания, лекарственные взаимодействия и ксенобиотики могут изменять активность КЭ у пациента, изменяя, таким образом, терапевтическую эффективность лекарственных препаратов — субстратов КЭ [17, 18]. О важности КЭ свидетельствует простое перечисление широко известных препаратов, для которых показан КЭ-гидролиз: антиагреганты (клопидогрел, аспирин и др), ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента (эналаприл, лизиноприл и др.), статины (симвастатин, ловастатин и др), противовирусные средства (тамифлю, валациклоvir и др.), иммунодепрессанты (метилпреднизолон и др.), противораковые препараты (капецитабин и др.) [17].

Поскольку КЭ ответственны за активацию многих пролекарств и инактивацию многих применяемых на практике лекарственных средств [17, 19], ингибиторы КЭ, влияющие на скорость гидролиза таких лекарственных препаратов, и таким образом определяющие скорость превращения пролекарства в действующее лекарство или, наоборот, увеличивающие полупериод жизни активного препарата, гидролизующегося КЭ, имеют важное терапевтическое значение [20, 21].

Для характеристики эффективности взаимодействия ингибиторов с эстеразами-мишенями *in vitro* ранее нами была предложена концепция «эстеразного профиля» — набора кинетических констант, описывающих ингибиторную активность соединения в отношении сериновых эстераз различной функциональной значимости [22–25]. Исходно данная концепция была разработана для фосфорорганических соединений, общим механизмом действия которых является ингибирование сериновых эстераз. Именно на фосфорорганических соединениях, которые необратимо фосфорилируют сериновые эстеразы, было показано, что эстеразный профиль антихолинэстеразных соединений, а именно, соотношение активностей АХЭ, нейротоксичной эстеразы (НТЭ), БХЭ и КЭ, определяет их эффекты *in vivo* [26, 27].

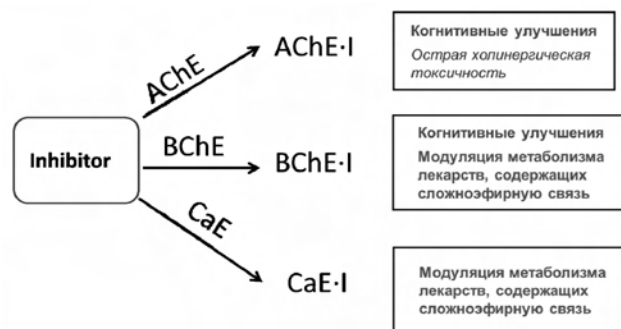


Рис. 1. Эстеразный профиль ингибиторов сериновых эстераз и их фармакологические эффекты.

Определение эстеразного профиля соединений путем оценки их ингибиторной активности в отношении трех мишеней-сериновых эстераз — АХЭ, БХЭ и КЭ (рис. 1) в сочетании с широким применением компьютерных методов анализа используется нами в настоящее время для поиска новых лекарственных препаратов — ингибиторов сериновых эстераз среди химических соединений разных классов. Сравнительная оценка ингибиторной активности соединений в отношении нескольких эстераз различной функциональной значимости в опытах *in vitro* позволяет получить более полную картину биологических эффектов соединений, тем самым выявить как основной потенциальный фармакологический эффект соединения, так и его возможные побочные эффекты, и уже на этапе первичного скрининга исключить соединения с нежелательными свойствами. Так, для эффективных ингибиторов холинэстераз — потенциальных средств терапии БА, ингибирование КЭ может приводить к нежелательным лекарственным взаимодействиям. В то же время для эффективных ингибиторов КЭ, разрабатываемых для модуляции гидролиза лекарств со сложноэфирными группами, нежелательно наличие антихолинэстеразной активности.

## 2. Ингибиторы холинэстераз как потенциальные препараты для лечения БА

Как отмечалось выше, функции холинергической нейромедиаторной системы существенно снижаются при развитии БА. Поиск препаратов, способных компенсировать утраченные функции данной нейромедиаторной системы, изначально рассматривался как наиболее очевидная страте-

гия создания средств терапии БА. Однако ингибиторы холинэстераз являются только симптоматическими препаратами [28]. Современным перспективным подходом к терапии комплексных, мультифакторных заболеваний, к которым относится БА, является создание мультифункциональных препаратов — мультитаргетных лигандов, взаимодействующих с несколькими мишенями, ответственными за патогенез [29, 30].

Известно, что АХЭ помимо классической функции гидролиза ацетилхолина обладает проагрегантными свойствами в отношении  $\beta$ -амилоида. АХЭ играет важную роль в процессинге  $\beta$ -амилоида через участие периферического анионного сайта (PAS), который взаимодействует с растворимыми пептидами  $\beta$ -амилоида, промотируя их агрегацию [31, 32]. Создание ингибиторов АХЭ, связывающихся с активным центром фермента и с PAS и таким образом нарушающих взаимодействие с PAS  $\beta$ -амилоида и препятствующих его агрегации, является одним из перспективных направлений антиамилоидной стратегии терапии БА. Такого рода соединения способны одновременно улучшать когнитивные функции и проявлять нейропротекторные свойства [33–35].

Согласно современным данным, окислительный стресс играет ключевую роль в патогенезе различных заболеваний, и в первую очередь в патогенезе острых и хронических нарушений мозгового кровообращения, нейродегенеративных патологий и др. Мозг, по сравнению с другими тканями, более чувствителен к повреждению свободными радикалами. Эффективность работы антиоксидантной системы в мозге постепенно снижается в процессе старения, причем в мозге больных БА это снижение происходит еще более резко. Все это обуславливает целесообразность использования антиоксидантов в терапии БА [36, 37], и создание ингибиторов холинэстераз с дополнительными антиоксидантными свойствами является одной из современных тенденций в развитии эффективной терапии БА [38, 39].

Одним из подходов к поиску мультитаргетных препаратов является создание гибридных структур — конъюгатов, содержащих два различных фармакофора, объединенных спейсером [40]. При этом в качестве одного из фармакофоров часто используют молекулу, обладающую антихолинэстеразными свойствами, а в качестве второго фармакофора вводят фрагменты, придающие конъюгатам антиоксидантные и/или антиагрегантные свойства [40, 41].

### 3. Конъюгаты такрина

Высокое сродство такринового фрагмента к каталитическому сайту АХЭ широко используется для создания на его основе гибридных соединений — конъюгатов с широким спектром фармакологической активности [42]. Введение через спейсер в молекулу такрина второго фармакофора, представляющего собой гетероциклическую или ароматическую молекулу, способствует повышению эффективности связывания гибридной структуры с PAS АХЭ [32, 33] и снижению связывания PAS с  $\beta$ -амилоидом. В качестве второго фармакофора мы использовали 1,2,4-тиадиазольный скаффолд. Производные 1,2,4-тиадиазола представляют большой интерес в связи с их широким спектром биологической активности, в том числе антиоксидантной [43, 44].

В совместной работе с лабораторией Специального органического синтеза ИФАВ РАН син-

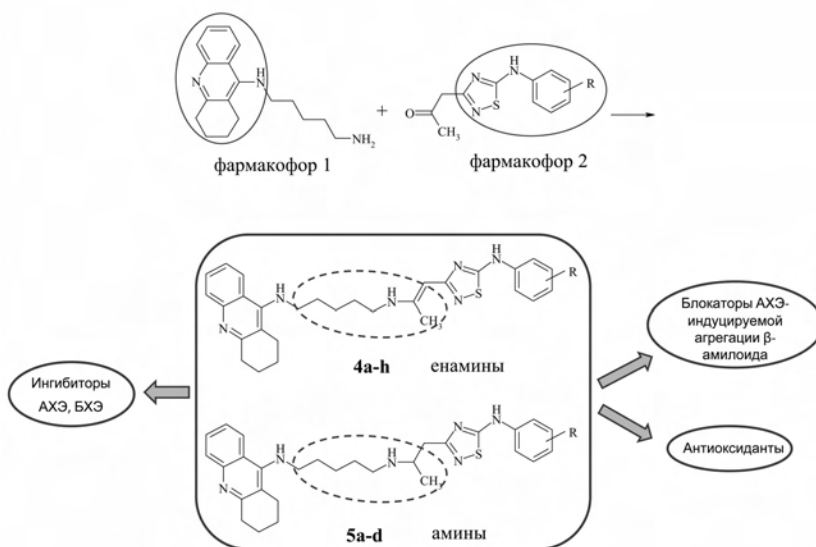


Рис. 2. Конъюгаты такрина с производными 1,2,4-тиадиазола и их биологическая активность.

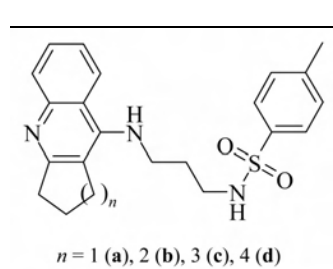
тезирован ряд соединений — оригинальных конъюгатов такрина с различными ароматическими заместителями в триадиазольном фрагменте (рис. 2) [45]. Для синтезированных соединений определен эстеразный профиль, исследованы антиоксидантные свойства и потенциальная способность блокировать АХЭ-индуцируемую агрегацию  $\beta$ -амилоида. Для всех конъюгатов показана высокая антихолинэстеразная активность с выраженной селективностью в отношении БХЭ и величинами  $IC_{50} = 4-80$  нМ, способность связываться с периферическим анионным сайтом АХЭ и вытеснять из него пропидий (21–32%), а также высокая антирадикальная активность в АБТС-тесте с величиной  $TEAC = 0.4-1.5$ . При этом конъюгаты с аминным фрагментом в спейсере обладали оптимальным эстеразным профилем (более эффективно ингибировали БХЭ и слабо ингибировали КЭ), тогда как конъюгаты с енаминовым фрагментом проявляли более высокую способность связывать свободные радикалы.

Оба типа конъюгатов являются ингибиторами смешанного типа и по результатам молекулярного докинга связываются как с каталитическим сайтом АХЭ (CAS), так и с периферическим анионным сайтом (PAS), что проиллюстрировано на примере соединений **4a** и **5a** (рис. 3). При этом вариация ароматического заместителя в триадиазольном фрагменте не влияет на биоло-

гическую активность конъюгатов. Полученные результаты показывают перспективность дальнейшей разработки данных конъюгатов такрина и оптимизации их структуры как с точки зрения multifunctionальной фармакологической активности, так и в плане повышения безопасности.

В следующей структурной модификации такрина в качестве второго фармакофора мы использовали ароматическую структуру пара-толилсульфонамида [46].

Анализ эстеразного профиля конъюгатов такрина с вариацией размера алифатического

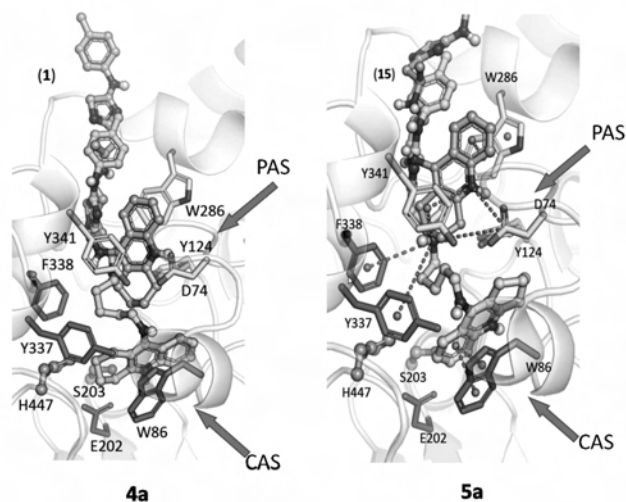


цикла в такриновом фрагменте показал, что все конъюгаты являются эффективными ингибиторами АХЭ и БХЭ. Наиболее активным в отношении АХЭ является

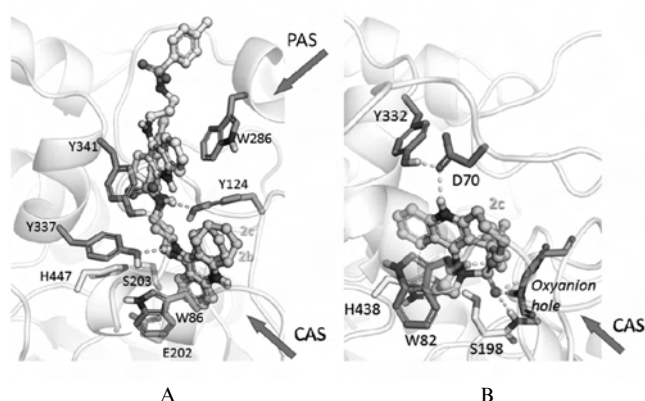
конъюгат с немодифицированным шестичленным такриновым циклом **2b** ( $n = 2$ ), ингибиторная активность которого лишь в 3 раза ниже, чем у такрина. В отношении БХЭ проявляет максимальную активность конъюгат **2c** с семичленным циклом ( $n = 3$ ), ингибирующий фермент в наномолярном диапазоне с величиной  $IC_{50}$ , очень близкой к величине  $IC_{50}$  такрина. Как и такрин, синтезированные конъюгаты проявляли большую селективность в отношении БХЭ по сравнению с АХЭ. Слабое ингибирование КЭ указывает на отсутствие потенциальных нежелательных лекарственных взаимодействий при применении данных конъюгатов в терапии БА.

Методом молекулярного докинга показано, что конъюгаты **2b** и **2c** связываются с активным сайтом АХЭ такриновым фрагментом за счет  $\pi-\pi$ -взаимодействий с Trp-286, а сульфонидамидный располагается выше по каналу, заходя в область PAS (рис. 4A). Можно ожидать, что с увеличением длины линкера лиганды будут больше заполнять PAS, становясь, таким образом, более эффективными ингибиторами обоих сайтов связывания. Расчеты также показали возможность связывания данных соединений, хотя и менее прочного, только в PAS АХЭ (см. рис. 4A).

Анализ связывания конъюгатов с БХЭ показал, что благодаря более широкому каналу БХЭ по сравнению с АХЭ [47] соединения лучше располагаются и более прочно связываются с актив-



**Рис. 3.** Положения соединений **4a** и **5a** в активном сайте АХЭ (CAS) и в периферическом анионном сайте (PAS). Каталитические остатки Ser203 и His447 показаны шарами и стержнями.



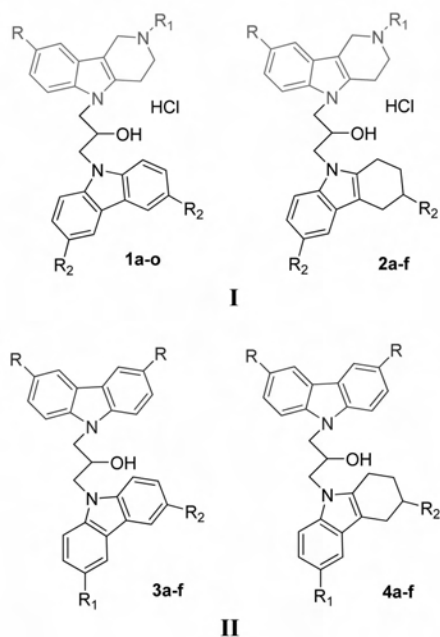
**Рис. 4.** Положения конъюгатов производных такрина с *para*-толилсульфонамидом в АХЭ и БХЭ по результатам молекулярного докинга. А — связывание соединений **2b** и **2c** с АХЭ; Б — связывание соединения **2c** с БХЭ.

ным сайтом БХЭ, при этом сульфогруппа занимает оксианионный центр (см. рис. 1Б).

#### 4. Конъюгаты производных индола

##### 4.1. Конъюгаты тетрагидро- $\gamma$ -карболинов и карбазолов

Проведено сравнительное исследование эстеразного профиля и антирадикальной активности двух групп гибридных соединений: конъюгатов тетрагидро- $\gamma$ -карболина с карбазолами и тетрагидрокарбазолами (**I**) и конъюгатов карбазола с карбазолами и тетрагидрокарбазолами (**II**), объединенных 2-гидроксипропиленовым спейсером [48, 49].



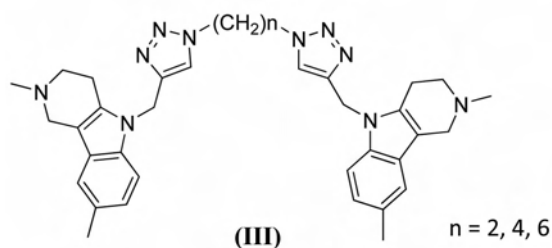
Конъюгаты тетрагидро- $\gamma$ -карболина с карбазолами и тетрагидрокарбазолами (**I**) эффективно и селективно ингибируют БХЭ и проявляют высокую антирадикальную активность. При этом комбинация тетрагидро- $\gamma$ -карболин – тетрагидрокарбазол является оптимальной как с точки зрения высокой анти-БХЭ активности ( $IC_{50} = 1-5$  мкМ), так и способности связывать свободные радикалы (ТЕАС = 0.7–0.9, АБТС тест).

Замена тетрагидро- $\gamma$ -карболинового фрагмента (конъюгаты **I**) на карбазольный (конъюгаты **II**) существенно снижает способность соединений ингибировать БХЭ и связывать свободные радикалы. По результатам молекулярного моделирования основной причиной более прочного связывания конъюгатов тетрагидро- $\gamma$ -карболина (**I**) в активном сайте БХЭ по сравнению с конъюгатами карбазола (**II**) является их способность к образованию ионных и  $\pi$ -катионных взаимодействий с аминокислотами, выстилающими канал БХЭ. Таким образом, конъюгаты производных тетрагидро- $\gamma$ -карболина и тетрагидрокарбазола являются наиболее перспективными соединениями в плане создания новых multifunctional препаратов, сочетающих в себе когнитивно-стимулирующие и антиоксидантные свойства.

##### 4.2. Бинарные конъюгаты тетрагидро- $\gamma$ -карболинов (**III**)

Проведено исследование антихолинэстеразной активности и антиоксидантных свойств бинарных конъюгатов тетрагидро- $\gamma$ -карболинов — аналогов Димебона, объединенных дитриазол-содержащими спейсерами различной длины [46].

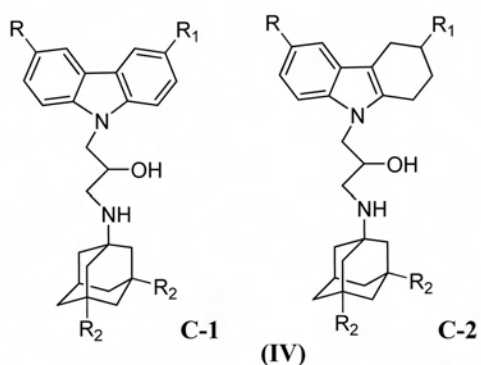
Показано, что изученные соединения по сравнению с их исходным прототипом — Димебоном обладают выраженными антихолинэстеразными и антиоксидантными свойствами, а также потенциальной способностью блокиро-



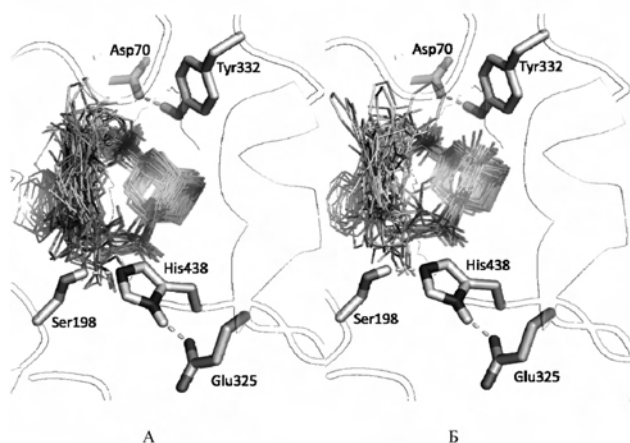
вать АХЭ-индуцируемую агрегацию  $\beta$ -амилоида. Это существенно расширяет спектр нейропротекторной активности данных конъюгатов по сравнению с прототипом — Димебоном — и делает их весьма перспективными кандидатами для дальнейшего исследования в качестве препаратов для лечения болезни Альцгеймера. Особого внимания заслуживает конъюгат с межтриазольным гексаметиленовым спейсером ( $n = 6$ ), который можно рассматривать как препарат-лидер в данном ряду соединений.

#### 4.3. Конъюгаты карбазолов с аминоадамантанами (IV)

С использованием методов ферментативной кинетики и молекулярного докинга исследована ингибиторная активность в отношении АХЭ, БХЭ и КЭ конъюгатов аминоадамантанов с производными карбазолов IV, объединенных 2-гидроксипропиленовым спейсером (C-1 и C-2) [50], а также ряда конъюгатов, объединенных этиленовым, 1-оксоэтиленовым, 1,4-диметилен-1,2,3-триазольным и 1-(2-оксоэтилен)-4-метилен-1,2,3-триазольным спейсером [51].



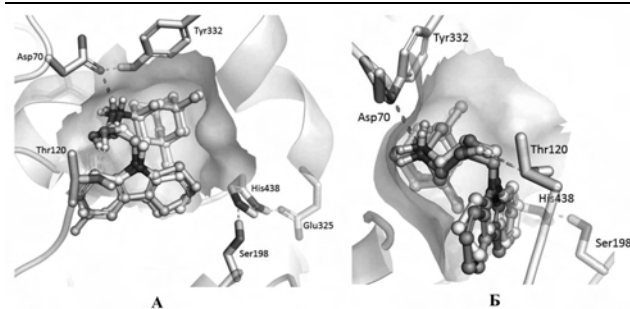
Установлено определяющее влияние природы спейсера для проявления соединением анти-БХЭ и радикал-связывающей активности. Конъюгаты, объединенные «гибкими» спейсерами — 2-гидроксипропиленовым, этиленовым, 1,4-диметилен-1,2,3-триазольным оказались эффективными и селективными ингибиторами БХЭ, ингибирующими фермент с  $IC_{50}$  в микромолярном диапазоне. При этом производные тетрагидрокарбазолов были несколько более активны по сравнению с производными карбазолов, а природа аминоадамантанового фрагмента



**Рис. 5.** Положения связывания, полученные в ходе 256 запусков процедуры молекулярного докинга с учетом кластеризации для соединений, содержащих амантадиновый (А) и мемантиновый (Б) и фрагменты. Прозрачная поверхность показывает часть канала БХЭ, охватывающую эти фрагменты. На переднем плане показаны остатки каталитической триады БХЭ Ser198·His438·Glu325, также показаны аминокислотные остатки PAS БХЭ Asp70 и Tyr332.

практически не влияла на анти-БХЭ активность, что согласуется с результатами молекулярного докинга (рис. 5, 6).

Конъюгаты с 2-гидроксипропиленовым спейсером показали также заметную радикал-связывающую активность в тесте АБТС.



**Рис. 6.** Молекулярный докинг конъюгатов C-1 и C-2 в активный центр БХЭ. Пунктирные линии показывают водородные связи (с Thr120) и солевые мостики (с Asp70). А) Положение соединений C-2b (желтый) и C-2h (IPAC-2015, проходящий доклинические испытания), различающихся наличием атома фтора в тетрагидрокарбазольном кольце, который приводит к развороту этого фрагмента. Б) Наложение соединений C-1b и C-2b, различающиеся присутствием в молекуле карбазольного (C-1b) или тетрагидрокарбазольного (C-2b) фрагментов. Точка обзора отличается от показанной на рис. 6А, и демонстрирует изгиб лигандов в канале БХЭ. По сравнению с рис. 6А, на котором каталитическая триада находится на переднем плане, обзор с противоположной стороны.

#### 4.4. Конъюгаты $\gamma$ -карболинов с фенотиразином и бис(диметиламино)фенотиразином — метиленовым синим (МС) (V)

Конъюгаты фенотиазина **C-1** и **C-2** независимо от типа спейсера — 1-оксопропиленовый (**C-1**) или 2-гидроксипропиленовый (**C-2**) — очень слабо ингибируют АХЭ и КЭ и проявляют высокую ингибиторную активность в отношении БХЭ, демонстрируя субмикромольную и микромольную активность и очень высокую селективность. При этом конъюгаты **C-1** и **C-2** более активны (самое активное соединение в 10–15 раз) по сравнению с базовыми фармакофорами — димебоном и фенотиразином. Соединения ингибируют БХЭ по смешанному механизму, что хорошо согласуется с результатами молекулярного докинга [52].

В то же время конъюгаты МС **C-3**, эффективно ингибируют АХЭ и БХЭ со значениями  $IC_{50}$  1–10 мкМ, проявляя очень низкую ингибиторную активность в отношении КЭ, что исключает нежелательные лекарственные взаимодействия, связанные с ингибированием этого фермента. Кинетические исследования показали, что конъюгаты являются обратимыми ингибиторами холинэстераз смешанного типа. По результатам молекулярного докинга соединения связываются как с каталитическим активным сайтом, так и с PAS АХЭ и БХЭ. Связывание

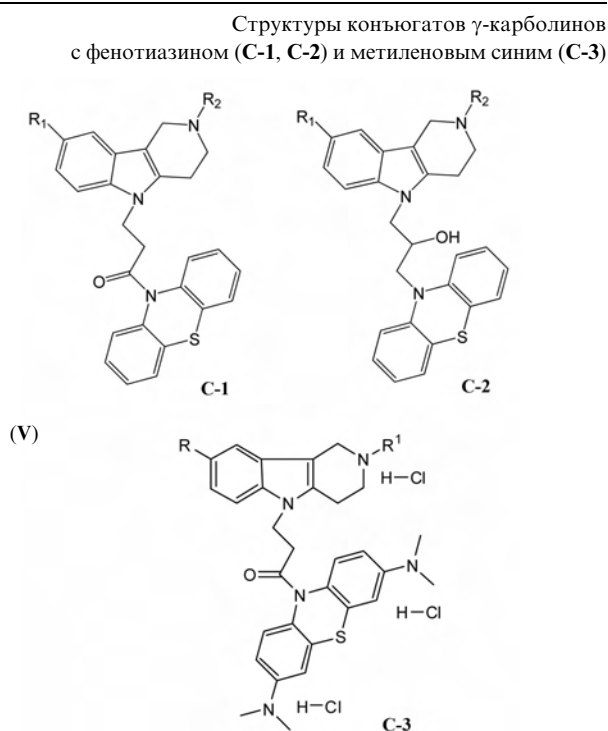
конъюгатов **C-3** с PAS АХЭ наряду с ингибированием АХЭ смешанного типа указывает на их влияние на АХЭ-индуцируемую агрегацию  $\beta$ -амилоида. Действительно, соединения эффективно вытесняют пропидий из периферического анионного сайта АХЭ (30–37% при 20 мкМ). Кроме того, конъюгаты **C-3** были чрезвычайно активны в обоих экспериментах по связыванию свободных радикалов: их активность была сопоставима с Тролоксом в тесте АВТС ( $TEAC = 0.96–1.08$ ) и существенно превышала Тролокс по способности связывать пероксильные радикалы в тесте ORAC-FL ( $TE = 7–10 TE$ ). Квантово-механические расчеты методом DFT позволяют предположить, что связывание свободных радикалов опосредуется фрагментом МС, вероятно, атомом серы [53].

#### 5. Ингибиторы карбоксилэстеразы

Как отмечалось выше, ингибиторы КЭ, регулирующие скорость превращения пролекарства в лекарство и, соответственно, его биодоступность и токсичность, а также увеличивающие полупериод жизни короткоживущих лекарств, чрезвычайно важны для рационального использования препаратов со сложноэфирными группами. Это приобретает особое значения в связи с показанными многочисленными полиморфизмами КЭ человека, которые приводят к отсутствию эффективности ряда препаратов.

Ингибиторы КЭ также остро необходимы в доклинических исследованиях на грызунах при разработке новых фармпрепаратов со сложноэфирными группами для их стабилизации, поскольку грызуны в отличие от человека имеют высокую активность КЭ плазмы [54]. До настоящего времени для этих целей использовался единственный ингибитор — бис-*пара*-нитрофенилфосфат.

Мы предложили новый мощный селективный ингибитор КЭ плазмы крови грызунов длительного действия — *O,O*-дибутил-*O*-(1-трифторметил-2,2,2-трифторэтил)фосфат (ВФР) [27, 55] (рис. 7): 0.5 мкМ ВФР ингибирует КЭ плазмы *in vitro* на  $90 \pm 3\%$  в течение 7 часов. ВФР имеет очень низкую острую токсичность ( $LD_{50}$  2000 мг/кг). В дозе 10 мг/кг (0.005  $LD_{50}$ ) ингибирование КЭ плазмы мышей составляет  $90 \pm 2\%$ ,  $83 \pm 3\%$ ,  $75 \pm 13\%$  через 0.5–1 ч, 2 ч и 6 ч соответственно. Селективные ингибиторы КЭ най-



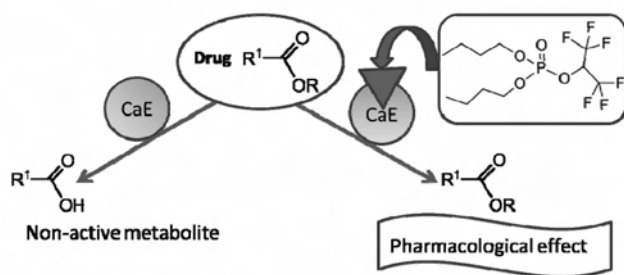
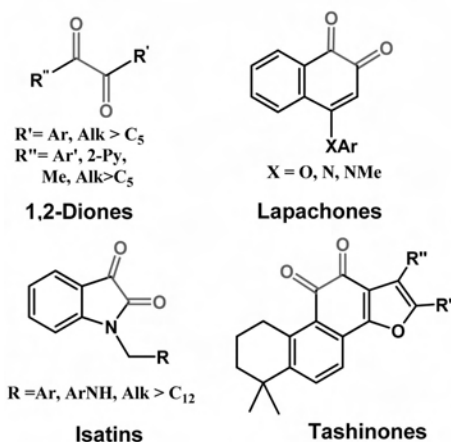


Рис. 7. Применение BFP для ингибирования КЭ плазмы грызунов.

дены также в ряду О-карбамоилированных гексафторизопропанолов [56].

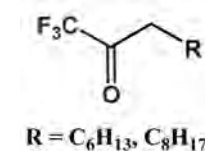
## 6. Селективные ингибиторы карбоксилэстеразы, найденные в сотрудничестве с ИОС УрО РАН

В литературе описаны следующие типы структур, проявляющих высокую активность и селективность в отношении КЭ [21, 57]:

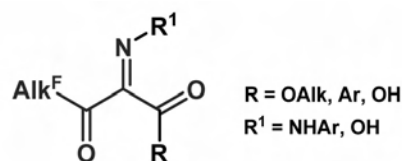


Для всех этих структур характерно наличие 1,2-дионового фрагмента. Другой важной группой ингибиторов сериновых эстераз, в том числе КЭ, являются трифторметилкетоны [21].

Нашим коллективом для создания эффективных ингибиторов КЭ был предложен оригинальный полифторалкил-2-имино-1,3-дионовый scaффолд, объединяющий в одной молекуле два известных хемотипа — трифторметилкетонный и 1,2-дионовый фрагменты, которые обуславливают ингибиторную активность и селективность в отношении КЭ. Отличитель-



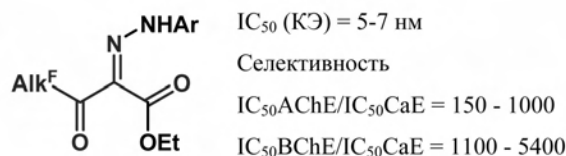
Полифторалкил-2-имино-1,3-дионовый scaффолд



ной особенностью данного scaффолда является замена одной карбонильной функции 1,2-дионового фрагмента на биоизостерную иминогруппу, которая может быть химически модифицирована.

Нами найдены высокоэффективные и селективные ингибиторы КЭ — алкил-2-арилгидразинилден-3-оксо-3-полифторалкилпропионаты **I** [58, 59], ингибирующие КЭ в наномолярном диапазоне, которые мы назвали Фоксины (Foxins).

Фоксины (I)

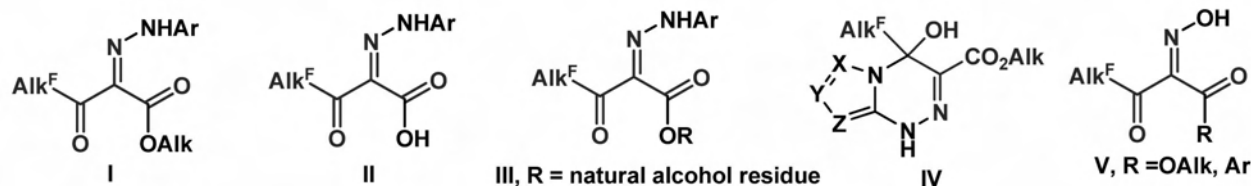


Соединения имеют хороший ADMET-профиль, в частности, высокую всасываемость из желудочно-кишечного тракта и низкую кардиотоксичность, обладают низкой цитотоксичностью и при этом обладают способностью связывать свободные радикалы. Полученные данные показывают перспективность дальнейших расширенных исследований по поиску в данном ряду активных и селективных ингибиторов КЭ с фармакокинетическими и токсикологическими характеристиками для применения *in vivo*. Следует также отметить, что соединения **I** являются легкодоступными, их синтез малостадийный, хорошо отработан и легко масштабируем.

Эффективные и селективные ингибиторы КЭ также были найдены при исследовании 7-гидрокси-7-полифторалкил-4,7-дигидроазоло[5,1-с]-[1,2,4]триазинов **IV**, которые являются циклическими изомерами алкил-2-гетарилгидразинилден-3-оксо-3-полифторалкилпропионатов [60].

Потенциал данных структур как ингибиторов КЭ для последующей модификации далеко не исчерпан. Об этом свидетельствуют недавно полученные данные о высокой анти-КЭ актив-

Структурные модификации 2-имино-3-полифторалкил-1,3-дионового скарфолда



ности и селективности для полифторалкил-2-имино-1,3-дионов, содержащих вместо ариламиногруппы в иминном фрагменте гидроксильный заместитель (соединения V), аналогов фоксинов с природными спиртовыми остатками R (соединения III) и кислот II, причем арилгидразоны с природными спиртовым остатками проявляли абсолютную ингибиторную селективность в отношении КЭ.

### 7. Сериновые эстеразы крови как биомаркеры воздействия фосфорорганических соединений (ФОС)

Свойство ФОС ковалентно связываться с серином активного центра сериновых эстераз позволяет использовать эстеразы крови в качестве биомаркера воздействия фосфорорганических соединений. Совокупность активностей 4-х сериновых эстераз: АХЭ, НТЭ, БХЭ и КЭ, а также активности параоксоназы (PON1), которая может гидролизовать и детоксицировать фосфорорганические соединения, нами было предложено объединить в понятие «эстеразный статус» организма [54, 61, 62]. Этот термин в настоящее время является общепринятым (рис. 8) [63].

Эстеразный статус в значительной степени определяет видовую и индивидуальную чувстви-

тельность к антихолинэстеразным соединениям и может быть использован в качестве комплексного биомаркера воздействия этих соединений. Совместно с лабораторией Постгеномной химии Химического факультета МГУ им. М.В.Ломоносова нами разработаны амперометрические биосенсоры для определения всех перечисленных эстераз в цельной крови [61, 64–66].

Мы провели детальное исследование изменения активности АХЭ, НТЭ, БХЭ и КЭ крови мышцей через 1 час после внутрибрюшинного введения возрастающих доз трех ФОС с различными эстеразным профилем и различной острой холинергической и отставленной нейротоксичностью: известного нейропатичного соединения О,О-дипропилдихлорвинилфосфата (di-PrDCIVP) в качестве контрольного соединения и двух модельных соединений, представителей фосфорилированных гексафторизопропанолов — этильного (diEt-PFP) и бутильного (diBu-PFP) производных (рис. 9) [67]. diPr-DCIVP — высокотоксичное соединение, одновременно обладающее высоким нейропатичным потенциалом [55, 68]; diEt-PFP обладает средней острой токсичностью и низким нейропатичным потенциалом [22]; более гидрофобный diBu-PFP наоборот имеет низкую острую токсичность и высокий нейропатичный потенциал [55].

Величины ED<sub>50</sub>, рассчитанные из полученных дозозависимостей, характеризуют чувствительность эстераз крови как биомаркеров воздействия для каждого соединения (табл. 1). Эстеразы-скэвенджеры БХЭ и КЭ, характеризующиеся более низкими величинами ED<sub>50</sub>, являются более чувствительными биомаркерами, чем АХЭ и НТЭ крови, поэтому они могут детектировать воздействие более низких доз ФОС-токсикантов. Оценка снижения активности БХЭ и КЭ позволяет выявить воздействие более низких доз ФОС и получить информацию о самом факте воздействия [69]. При этом БХЭ и КЭ чувствительны к воздействию агентов, вы-

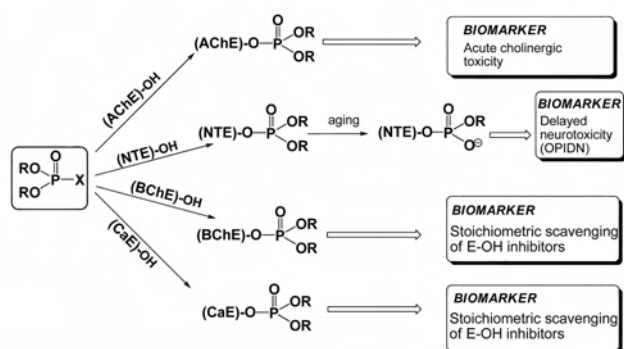
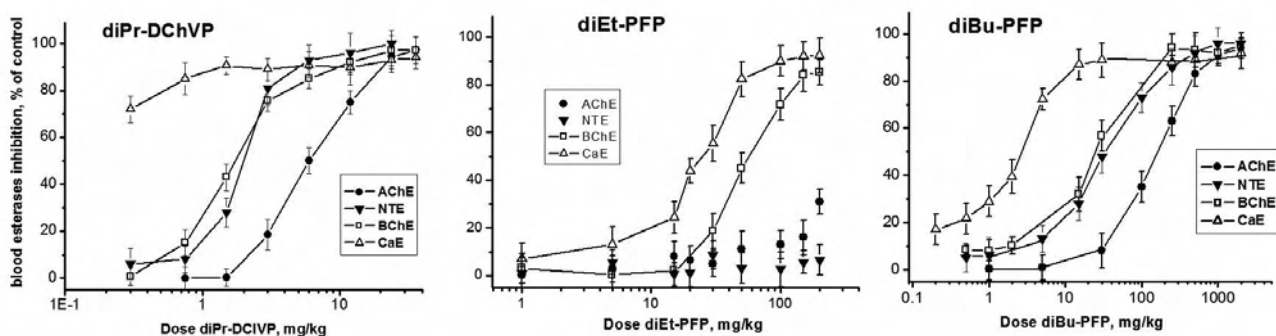


Рис. 8. Взаимодействие ФОС с различными сериновыми эстеразами (E – OH), их возможные токсические эффекты, роль в механизмах токсичности и функции в качестве биомаркеров.





**Рис. 9.** Дозозависимое ингибирование АХЭ, НТЭ, БХЭ и КЭ в крови мышей через 1 час после внутрибрюшинного введения diPr-DCIVP, diEt-PFP и diBu-PFP. Результаты представлены в виде % ингибирования активности каждой из эстераз у контрольных животных, mean  $\pm$  SEM,  $n = 6$ . Активности эстераз у контрольных животных, мкмоль/(мин·мл) крови, mean  $\pm$  SEM: АХЭ —  $1.02 \pm 0.15$  ( $N = 12$ ), БХЭ —  $0.63 \pm 0.03$  ( $N = 12$ ), КЭ —  $6.2 \pm 0.14$  ( $N = 12$ ), НТЭ —  $0.017 \pm 0.003$  ( $N = 8$ ).

**Таблица 1.** Эффективность ингибирования ( $ED_{50}$ , мг/кг) эстераз крови мышей через 1 час после внутрибрюшинного введения diEt-PFP, diBu-PFP и diPr-DCIVP.

Соединение	$ED_{50}$ , мг/кг				$ED_{50}(\text{НТЭ})/ED_{50}(\text{АХЭ})$
	АХЭ	НТЭ	БХЭ	КЭ	
diEt-PFP	> 300*	нет ингибирования при дозе 200 мг/кг	$46.8 \pm 1.5$	$25.0 \pm 1.0$	0
diBu-PFP	$154 \pm 5$	$36.3 \pm 3.6$	$25.1 \pm 3.6$	$3.1 \pm 0.3$	4.24
diPr-DCIVP	$4.0 \pm 0.2$	$2.0 \pm 0.1$	$1.58 \pm 0.11$	< 0.2 **	2.0

\* 30% ингибирования при дозе 200 мг/кг; \*\* 70% ингибирования при дозе 0.3 мг/кг.

зывающих как острую, так и отставленную нейротоксичность, поэтому степень их ингибирования может служить общим биомаркером воздействия ФОС.

Одновременное определение активности АХЭ и НТЭ в крови позволяет дифференцировать воздействие острых и отставленных нейротоксикантов. Соотношение между ингибированием НТЭ и АХЭ, измеренное в крови, характеризует вероятность развития ОНТФОС по сравнению с острой холинэргической токсичностью. Как показывают результаты исследования, ингибирование всех эстераз крови имеет дозозависимый характер, поэтому степень ингибирования эстераз крови позволяет оценить степень воздействия, которая дает ценную информацию для терапии отравления.

Таким образом, проведенное исследование с использованием фосфорорганических соединений, обладающих широким спектром собственной ингибиторной активности в отношении анализируемых эстераз и широким интервалом

острой и отставленной нейротоксичности, показывает, что эстеразный статус, объединяющий как биомаркеры воздействия ФОС, так и биомаркеры чувствительности организма к этим соединениям, можно рассматривать в

качестве комплексного биомаркера воздействия ФОС. При этом эстеразный статус как комплексный биомаркер является более эффективным и информативным по сравнению со стандартным определением БХЭ плазмы, АХЭ эритроцитов и НТЭ лимфоцитов. Определение эстеразного статуса позволяет: 1) оценить сам факт воздействия ФОС на человека или подтвердить его отсутствие; 2) определить, обусловлено ли воздействие агентами, вызывающими острую и/или отставленную нейротоксичность; и 3) провести дозиметрию воздействия, которая даст ценную информацию для лечения.

## 8. Заключение

С использованием концепции эстеразного профиля найден ряд эффективных и селективных ингибиторов холинэстераз как потенциальных препаратов терапии БА, а также ряд высокоактивных и селективных ингибиторов КЭ для модуляции скорости гидролитического метаболизма многочисленных лекарственных препара-

тов со сложноэфирными группами. Широкое использование методов компьютерного моделирования в совокупности с оценкой антирадикальной активности синтезированных соединений и исследованием ингибиторов АХЭ как блокаторов АХЭ-индуцируемой агрегации  $\beta$ -амилоида, позволило найти высокоактивные мультифункциональные соединения. Показано, что эстеразный статус организма, включающий 4 сериновые эстеразы — АХЭ, НТЭ, БХЭ и КЭ, может быть использован в качестве эффективного и информативного комплексного биомаркера для биомониторинга отравления фосфорорганическими соединениями.

## Литература

1. J.Z.Long, B.F.Cravatt. *Chem. Rev.*, **111**, 6022 (2011)
2. D.A.Bachovchin, B.F.Cravatt. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **11**, 52 (2012)
3. S.O.Bachurin. *Med. Res. Rev.*, **23**, 48 (2003)
4. H.W.Klafki, M.Staufenbiel, J.Kornhuber, J.Wiltfang. *Brain*, **129**, 2840 (2006)
5. J.Rodda, J.Carter. *BMJ*, **344**, e2986 (2012)
6. E.Giacobini. *Neurochem. Res.*, **28**, 515 (2003)
7. N.H.Greig, T.Utsuki, D.K.Ingram, Y.Wang, G.Pepeu, C.Scali, Q.S.Yu, J.Mamczarz, H.W.Holloway, T.Giordano, D.Chen, K.Furukawa, K.Sambamurti, A.Brossi, D.K.Lahiri. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 17213 (2005)
8. M.M.Mesulam, A.Guillozet, P.Shaw, A.Levey, E.G.Duysen, O.Lockridge. *Neuroscience*, **110**, 627 (2002)
9. E.G.Duysen, B.Li, S.Darvesh, O.Lockridge. *Toxicology*, **233**, 60 (2007)
10. C.Ballard, N.Greig, A.Guillozet-Bongaarts, A.Enz, S.Darvesh. *Curr. Alzheimer Res.*, **2**, 307 (2005)
11. R.M.Lane, S.G.Potkin, A.Enz. *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, **9**, 101 (2006)
12. Y.Furukawa-Hibi, T.Alkam, A.Nitta, A.Matsuyama, H.Mizoguchi, K.Suzuki, S.Moussaoui, Q.S.Yu, N.H.Greig, T.Nagai, K.Yamada. *Behav. Brain Res.*, **225**, 222 (2011)
13. I.R.Macdonald, K.Rockwood, E.Martin, S.Darvesh. *J. Alzheimers Dis.*, **42**, 379 (2014)
14. S.Darvesh, G.A.Reid. *Chem. Biol. Interact.*, **259**, 307 (2016)
15. T.Imai, K.Ohura. *Curr. Drug Metab.*, **11**, 793 (2010)
16. S.Jana, S.Mandlekar, P.Marathe. *Curr. Med. Chem.*, **17**, 3874 (2010)
17. S.C.Laizure, V.Herring, Z.Hu, K.Witbrodt, R.B.Parker. *Pharmacotherapy*, **33**, 210 (2013)
18. S.D.Varfolomeev, S.V.Lushchekina, A.V.Nemukhin, A.M.Kulakova, E.D.Kots, G.F.Makhaeva, H.Delacour, O.Lockridge, P.Masson. *Russ. Chem. Bull., Int. Ed.*, **65**, 1592 (2017)
19. T.Satoh, M.Hosokawa. *Chem. Biol. Interact.*, **162**, 195 (2006)
20. P.Potter, R.Wadkins. *Curr. Med. Chem.*, **13**, 1045 (2006)
21. M.J.Hatfield, P.M.Potter. *Expert Opin. Ther. Pat.*, **21**, 1159 (2011)
22. G.F.Makhaeva, O.G.Serebryakova, N.P.Boltneva, T.G.Galenko, A.Y.Aksinenko, V.B.Sokolov, I.V.Martynov. *Dokl. Biochem. Biophys.*, **423**, 352 (2008)
23. G.F.Makhaeva, E.V.Radchenko, I.I.Baskin, V.A.Palyulin, R.J.Richardson, N.S.Zefirov. *SAR QSAR Environ. Res.*, **23**, 627 (2012)
24. G.F.Makhaeva, E.V.Radchenko, V.A.Palyulin, E.V.Rudakova, A.Y.Aksinenko, V.B.Sokolov, N.S.Zefirov, R.J.Richardson. *Chem. Biol. Interact.*, **203**, 231 (2013)
25. E.V.Rudakova, G.F.Makhaeva, T.G.Galenko, A.Y.Aksinenko, V.B.Sokolov, R.J.Richardson, I.V.Martynov. *Dokl. Biochem. Biophys.*, **443**, 81 (2012)
26. G.F.Makhaeva, E.V.Rudakova, O.G.Serebryakova, A.Y.Aksinenko, R.J.Richardson, S.O.Bachurin. *Russ. Chem. Bull., Int. Ed.*, **64**, 2203 (2015)
27. G.F.Makhaeva, E.V.Rudakova, O.G.Serebryakova, A.Y.Aksinenko, S.V.Lushchekina, S.O.Bachurin, R.J.Richardson. *Chem. Biol. Interact.*, **259**, 332 (2016)
28. A.Martinez, A.Castro. *Expert Opin. Investig. Drugs*, **15**, 1 (2006)
29. M.C.Carreiras, E.Mendes, M.J.Perry, A.P.Francisco, J.Marco-Contelles. *Curr. Top. Med. Chem.*, **13**, 1745 (2013)
30. S.O.Bachurin, E.V.Bovina, A.A.Ustyugov. *Med. Res. Rev.*, **37**, 1186 (2017)
31. G.V.De Ferrari, M.A.Canales, I.Shin, L.M.Weiner, I.Silman, N.C.Inestrosa. *Biochemistry*, **40**, 10447 (2001)
32. N.C.Inestrosa, M.C.Dinamarca, A.Alvarez. *FEBS J.*, **275**, 625 (2008)
33. M.P.Arce, M.I.Rodriguez-Franco, G.C.Gonzalez-Munoz, C.Perez, B.Lopez, M.Villarroya, M.G.Lopez, A.G.Garcia, S.Conde. *J. Med. Chem.*, **52**, 7249 (2009)
34. P.Camps, X.Formosa, C.Galdeano, T.Gomez, D.Munoz-Torrero, L.Ramirez, E.Viayna, E.Gomez, N.Isambert, R.Lavilla, A.Badia, M.V.Clos, M.Bartolini, F.Mancini, V.Andrisano, A.Bidon-Chanal, O.Huertas, T.Dafni, F.J.Luque. *Chem. Biol. Interact.*, **187**, 411 (2010)
35. V.E.Semenov, I.V.Zueva, M.A.Mukhamedyarov, S.V.Lushchekina, A.D.Kharlamova, E.O.Petukhova, A.S.Mikhailov, S.N.Podyachev, L.F.Saifina, K.A.Petrov, O.A.Minnekhanova, V.V.Zobov, E.E.Nikolsky, P.Masson, V.S.Reznik. *ChemMedChem*, **10**, 1863 (2015)
36. P.I.Moreira, S.L.Siedlak, G.Aliev, X.Zhu, A.D.Cash, M.A.Smith, G.Perry. *J. Neural. Transm.*, **112**, 921 (2005)
37. R.Floyd, K.Hensley. *Neurobiol. Aging*, **23**, 795 (2002)
38. M.Rosini, E.Simoni, M.Bartolini, A.Tarozzi, R.Matera, A.Milelli, P.Hrelia, V.Andrisano, M.L.Bolognesi, C.Melchiorre. *Eur. J. Med. Chem.*, **46**, 5435 (2011)
39. N.Guzior, A.Wieckowska, D.Panek, B.Malawska. *Curr. Med. Chem.*, **22**, 373 (2015)
40. M.L.Bolognesi, A.Cavalli. *ChemMedChem*, **11**, 1190 (2016)
41. A.Agis-Torres, M.Solhuber, M.Fernandez, J.M.Sanchez-Montero. *Curr. Neuropharmacol.*, **12**, 2 (2014)
42. A.Minarini, A.Milelli, E.Simoni, M.Rosini, M.Bolognesi, C.Marchetti, V.Tumiatti. *Curr. Top. Med. Chem.*, **13**, 1771 (2013)
43. G.F.Makhaeva, A.N.Proshin, N.P.Boltneva, E.V.Rudakova, N.V.Kovaleva, O.G.Serebryakova, I.V.Serkov, S.O.Bachurin. *Russ. Chem. Bull., Int. Ed.*, **65**, 1586 (2016)

44. V.V.Grigoirev, G.F.Makhaeva, A.N.Proshin, N.V.Kovaleva, E.V.Rudakova, N.P.Boltneva, A.V.Gabrel'yan, B.V.Lednev, S.O.Bachurin. *Russ. Chem. Bull., Int. Ed.*, **66**, 1308 (2017)
45. G.F.Makhaeva, V.V.Grigoirev, A.N.Proshin, N.V.Kovaleva, E.V.Rudakova, N.P.Boltneva, I.V.Serkov, S.O.Bachurin. *Dokl. Biochem. Biophys.*, **477**, 405 (2017)
46. Г.Ф.Махаева, Н.В.Ковалева, С.В.Лушекина, Е.В.Рудакова, Н.П.Болтнева, А.Н.Прошин, Б.В.Леднев, И.В.Серков, С.О.Бачурин. *Доклады АН. Биохим.* (в печати)
47. A.D.Kharlamova, S.V.Lushchekina, K.A.Petrov, E.D.Kots, F.Nachon, M.Villard-Wandhammer, I.V.Zueva, E.Krejci, V.S.Reznik, V.V.Zobov, E.E.Nikolsky, P.Masson. *Biochem. J.*, **473**, 1225 (2016)
48. G.F.Makhaeva, V.B.Sokolov, E.F.Shevtsova, N.V.Kovaleva, S.V.Lushchekina, N.P.Boltneva, E.V.Rudakova, A.Y.Aksinenko, P.N.Shevtsov, M.E.Neganova, L.G.Dubova, S.O.Bachurin. *Pure Appl. Chem.*, **89**, 1167 (2017)
49. Г.Ф.Махаева, Н.П.Болтнева, Н.В.Ковалева, Е.В.Рудакова, С.В.Лушекина, А.Ю.Аксиненко, В.Б.Соколов. *Изв. АН. Сер. хим.* (в печати)
50. S.O.Bachurin, E.F.Shevtsova, G.F.Makhaeva, V.V.Grigoirev, N.P.Boltneva, N.V.Kovaleva, S.V.Lushchekina, P.N.Shevtsov, M.E.Neganova, O.M.Redkozubova, E.V.Bovina, A.V.Gabrelyan, V.P.Fisenko, V.B.Sokolov, A.Y.Aksinenko, V.Echeverria, G.E.Barreto, G.Aliev. *Sci. Rep.*, **7**, 45627 (2017)
51. Г.Ф.Махаева, Е.Ф.Шевцова, Н.В.Ковалева, Е.В.Рудакова, М.Е.Неганова, Л.Г.Дубова, П.Н.Шевцов, А.Ю.Аксиненко, В.Б.Соколов, С.О.Бачурин. *Изв. АН. Сер. хим.* (в печати)
52. G.F.Makhaeva, S.V.Lushchekina, N.P.Boltneva, V.B.Sokolov, V.V.Grigoirev, O.G.Serebryakova, E.A.Vikhareva, A.Y.Aksinenko, G.E.Barreto, G.Aliev, S.O.Bachurin. *Sci. Rep.*, **5**, 13164 (2015)
53. S.O.Bachurin, G.F.Makhaeva, E.F.Shevtsova, N.P.Boltneva, N.V.Kovaleva, S.V.Lushchekina, E.V.Rudakova, L.G.Dubova, D.V.Vinogradova, V.B.Sokolov, A.Y.Aksinenko, V.P.Fishenko, R.J.Richardson, G.E. Barreto, G. Aliev. *Sci. Rep.* (in press)
54. E.V.Rudakova, N.P.Boltneva, G.F.Makhaeva. *Bull. Exp. Biol. Med.*, **152**, 73 (2011)
55. E.V.Rudakova, G.F.Makhaeva, T.G.Galenko, A.Y.Aksinenko, V.B.Sokolov, I.V.Martynov. *Dokl. Biochem. Biophys.*, **449**, 87 (2013)
56. G.F.Makhaeva, N.P.Boltneva, G.R.Mukhamadieva, V.B.Sokolov, T.G.Galenko. Патент 2449988 (2012)
57. D.D.Wang, L.W.Zou, Q.Jin, J.Hou, G.B.Ge, L.Yang. *Fitoterapia*, **117**, 84 (2017)
58. Y.V.Burgart, G.F.Makhaeva, E.V.Shchegol'kov, O.G.Khudina, N.P.Boltneva, O.G.Serebryakova, S.V.Lushchekina, V.I.Saloutin, S.O.Bachurin, O.N.Chupakhin. Патент 2574291 (2015)
59. N.P.Boltneva, G.F.Makhaeva, N.V.Kovaleva, S.V.Lushchekina, Y.V.Burgart, E.V.Shchegol'kov, V.I.Saloutin, O.N.Chupakhin. *Dokl. Biochem. Biophys.*, **465**, 381 (2015)
60. E.V.Shchegol'kov, G.F.Makhaeva, N.P.Boltneva, S.V.Lushchekina, O.G.Serebryakova, E.V.Rudakova, N.V.Kovaleva, Y.V.Burgart, V.I.Saloutin, O.N.Chupakhin, S.O.Bachurin, R.J.Richardson. *Bioorg. Med. Chem.*, **25**, 3997 (2017)
61. L.G.Sokolovskaya, L.V.Sigolaeva, A.V.Eremenko, I.N.Kurochkin, G.F.Makhaeva, V.V.Malygin, I.E.Zykova, V.I.Kholstov, N.V.Zavyalova. *Russ. Chem. J.*, 1–2, 21 (2004)
62. G.Makhaeva, E.Rudakova, N.Boltneva, L.Sigolaeva, A.Eremenko, I.Kurochkin, R.Richardson. In *Counteraction to Chemical and Biological Terrorism in East European Countries*. (Eds C. Dishovsky, A. Pivovarov). Springer Netherlands, 2009. P. 177
63. I.D.Kurdyukov, V.I.Shmurak, A.D.Nadeyev, N.G.Voitenko, D.S.Prokofyeva, N.V.Goncharov. *Toxicol. Rev. (Rus.)*, **6**, 6 (2012)
64. G.F.Makhaeva, L.V.Sigolaeva, L.V.Zhuravleva, A.V.Eremenko, I.N.Kurochkin, V.V.Malygin, R.J.Richardson, *J. Toxicol. Environ. Health, Part A*, **66**, 599 (2003)
65. L.Sigolaeva, G.Makhaeva, E.Rudakova, N.Boltneva, M.Porus, G.Dubacheva, A.Eremenko, I.Kurochkin, R.J.Richardson. *Chem. Biol. Interact.*, **187**, 312 (2010)
66. I.N.Kurochkin, L.V.Sigolaeva, A.V.Eremenko, E.A.Dontsova, M.S.Gromova, E.V.Rudakova, G.F.Makhaeva. In *Toxicological Problems*. (Eds C.Dishovsky, J.R.Saeva). Military Publishing House, Sofia, Bulgaria, 2014. P. 51
67. G.F.Makhaeva, E.V.Rudakova, L.V.Sigolaeva. In *Toxicological Problems*. (Eds C.Dishovsky, J.R.Saeva). Military Publishing House, Sofia, Bulgaria, 2014. P. 15
68. M.Lotti, M.K.Johnson. *Arch. Toxicol.*, **41**, 215 (1978)
69. L.G.Costa. *Environ. Health Perspect.*, **104** (Suppl. 1), 55 (1996)

# Природные сесквитерпеновые лактоны как основа для создания мультитаргетных гибридных молекул с противоопухолевыми свойствами

С.Г.Клочков, М.Е.Неганова, С.А.Пухов, Л.А.Аникина, А.В.Семаков, С.В.Афанасьева

*Лаборатория природных соединений ИФАВ РАН*

## 1. Введение

Развитие медицинских технологий в современном обществе ведет к увеличению средней продолжительности жизни. Вместе с этим возрастает число заболеваний, связанных со сбоями метаболических процессов. Среди социально-значимых болезней особое место занимают онкологические заболевания. В настоящее время поиск эффективных средств для лечения злокачественных новообразований является одним из наиболее актуальных направлений современной медицинской химии. Сложность адекватного химиотерапевтического лечения определяется большим разнообразием патогенеза и этиологии опухолей, их развитием и симптоматикой, феноменом резистентности опухолей. Недостатки применяемых химиотерапевтических средств обусловлены их высокой токсичностью для организма человека. В связи с этим большое внимание уделяется проблеме разработки высокоэффективных противоопухолевых лекарственных

препаратов и подходов, позволяющих снизить побочные эффекты их применения, а также преодолеть лекарственную устойчивость. В последнее время особое значение придается поиску лекарств мультитаргетного действия, способных воздействовать на разные звенья патогенеза онкологических заболеваний.

В терапии рака огромную роль играют цитотоксические препараты. Тем не менее, поскольку механизм их действия заключается в клеточной деструкции, недостатком является то, что такие препараты воздействуют в том числе и на здоровые клетки, что приводит к возникновению нежелательных эффектов в тканях с высокой скоростью обновления клеток. Кроме того, другой значительный недостаток химиотерапии состоит в развитии мультirezистентности к лекарственным препаратам. Одна из наиболее успешных стратегий создания противоопухолевых препаратов заключается в дизайне и синтезе новых соединений, индуцирующих дифференциацию опухолевых клеток, на основе известных химических структур. Важным классом дифференцирующих соединений являются производные антимагнетоболитов, включая вторичные метаболиты растений, которые влияют на синтез и метаболизм нуклеиновых кислот, воздействуя на ключевые ферменты синтеза ДНК. Так, например, был открыт ряд аналогов нуклеозидов, расширяющих противоопухолевый спектр исходных соединений и/или модифицирующих их фармакологические и/или фармакокинетические свойства [1]. В большом числе исследований, проведенных в последнее время, была продемонстрирована связь между регуляцией клеточного цикла и развитием опухоли, и показано, что

---

**С.Г.Клочков.** Кандидат биологических наук, главный научный сотрудник, заведующий лабораторией природных соединений. e-mail: klochkov@ipac.ac.ru

**М.Е.Неганова.** Кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биомолекулярного скрининга. e-mail: neganova83@mail.ru

**С.А.Пухов.** Кандидат химических наук, научный сотрудник лаборатории природных соединений. e-mail: pukhov.sergey@gmail.com

**Л.А.Аникина.** Кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории природных соединений. e-mail: anikina1970@gmail.com

**А.В.Семаков.** Младший научный сотрудник той же лаборатории. e-mail: L\_vok@list.ru

**С.В.Афанасьева.** Кандидат химических наук, старший научный сотрудник той же лаборатории. e-mail: svafa@ipac.ac.ru

ингибиторы клеточного цикла рассматриваются как средство воздействия на опухолевые клетки [2]. Возник значительный интерес к молекулам, регулирующим Go/G1 фазу клеточного цикла, таким как циклин D1, ингибиторы циклин-зависимых киназ, ингибиторы p53, ингибиторы ключевых ферментов инициации апоптоза и малигнизации [3, 4].

Природные соединения всегда занимали особое место в стратегии создания фармацевтических препаратов. Среди противоопухолевых лекарственных средств большая часть является соединениями, так или иначе связанными с вторичными метаболитами живых организмов [5]. К 2009 г. было разрешено к применению около 206 противоопухолевых препаратов, которые можно по происхождению распределить следующим образом: «биологический» препарат, обычно пептид или белок, выделенный из организма/клеточной линии или полученный с помощью биотехнологии (13%); непосредственно природное соединение (13%); модифицированное природное соединение (28%); синтетическое соединение, оптимизированное природным фармакофором (10%) [6]. Таким образом, вклад природных соединений растительного происхождения в противоопухолевую терапию представляется довольно значительным. Поскольку структуры таких соединений оптимизировались в течение многих веков эволюции, они характеризуются огромным химическим разнообразием и уникальным спектром биологических функций [7]. Несмотря на то, что конец XX века ознаменовался бурным развитием синтетической медицинской химии, природные соединения остаются ценным источником новых лекарственных препаратов [8, 9]. В последние годы появилось много исследований, посвященных получению их полусинтетических аналогов с улучшенным фармакологическим профилем [6]. В настоящее время среди соединений, обладающих противоопухолевой активностью, все большее внимание уделяется сесквитерпеновым лактонам и алкалоидам. Особое место занимают  $\gamma$ -лактоны с активированной двойной связью, играющей важную роль в их химических превращениях, в том числе в живых организмах. Интерес к изучению противоопухолевых свойств природных сесквитерпеновых лактонов и их производных нашел свое отражение в многочисленных работах рос-

сийских и зарубежных авторов. Например, исследования таких соединений включены в программу скрининга Национального института рака США (NCI, США). В настоящее время клинические испытания проходят несколько представителей этого класса соединений: биодоступная форма партенолида (диметиламинопартенолид) [10, 11] и тапсигаргин [12], а противоопухолевый препарат на основе аминокпроизводного сесквитерпенового  $\gamma$ -лактона арглабина зарегистрирован в качестве противоопухолевого лекарственного средства в 6 странах постсоветского пространства. Противомаларийные препараты на основе лактона артемизинина (Нобелевская премия по физиологии и медицине за 2015 год) в настоящее время также рассматриваются как потенциальные противоопухолевые агенты. Все эти успешные примеры применения сесквитерпеновых лактонов в качестве средств для лечения злокачественных новообразований вызвали большой интерес к этим соединениям [13–17].

Как показывает анализ литературных данных, в качестве молекулярных мишеней действия сесквитерпеновых лактонов рассматривается ряд сигнальных путей, которые включают ферменты, белки и рецепторы, затрагивающие основные малигнанные свойства опухолевых клеток и связанные с регуляцией апоптоза. Одной из основных мишеней противоопухолевого действия сесквитерпеновых лактонов является сигнальный путь NF- $\kappa$ B (включая TNF- $\alpha$ ). Транскрипционный фактор NF- $\kappa$ B контролирует экспрессию генов иммунного ответа (продукцию цитокинов), адгезии опухолевых клеток, апоптоза и клеточного цикла (пролиферацию и дифференциацию) [18]. Антиапоптотическая активность NF- $\kappa$ B, реализуемая через ингибирование экспрессии антиапоптотических белков семейства Bcl-2 и ингибитора каспаз [19], — один из главных механизмов формирования устойчивости опухолевых клеток к химиотерапии. Недавно показана способность сесквитерпеновых лактонов ингибировать активность нуклеарного фактора NF- $\kappa$ B, одновременно активируя проапоптотическое действие белка p53. Сесквитерпеновые лактоны способны модулировать активность NF- $\kappa$ B, ингибируя фосфорилирование ингибиторной  $\kappa$ B (I $\kappa$ B)- $\alpha$  и I $\kappa$ B киназы (IKK) [20] и снижая уровень NF- $\kappa$ B/p65 [21].

Сигнальный путь Ras/Raf/MAPK/PI-3K регулирует процессы малигнизации клеток, такие как пролиферация, клеточный рост [22], апоптоз и формирование цитоскелета [23]. Этот сигнальный путь часто гиперактивирован в большом количестве опухолей (около 30%) [24]. Существенную роль в этом сигнальном пути играют белки-онкогены семейства *ras* [4]. Сесквитерпеновые лактоны проявляют активность как ингибиторы фарнезилтрансферазы, блокируя сигнальный путь Ras/Raf/MAPK/PI-3K на начальном этапе и препятствуя фарнезилрованию онкогенов семейства *ras* [25, 26]. Кроме того, лактоны способны ингибировать фосфорилирование киназы Akt [27], также участвующей в этом сигнальном пути.

Важным звеном противоопухолевого действия сесквитерпеновых лактонов, как и многих противоопухолевых препаратов, является влияние на функционирование митохондрий, в частности высвобождение проапоптотических факторов, например цитохрома С. Показано, что изоалантолактон достоверно снижает митохондриальный потенциал ( $\Delta\Psi_m$ ) [28], вызывает деполяризацию митохондриальной мембраны и набухание митохондрий, что приводит к высвобождению цитохрома С в цитозоль [29] и вызывает активацию каспазы 3 (и в целом каспазного пути апоптоза).

Гистоновые деацетилазы (HDACs) — ферменты, которые катализируют отщепление ацетильных групп от ацетиллизиновых остатков многих белков. Они вовлечены в формирование хроматина и являются популярными мишенями для разработки противоопухолевых препаратов [30]. Ингибиторы HDACs увеличивают ацетилирование гена белка p53 и его транскрипцию, что приводит к усилению экспрессии проапоптотических белков Bax, BAK2, PIG3 и, в итоге, к индукции апоптоза [31]. В соответствии с этим гистоновые деацетилазы рассматриваются как перспективная молекулярная мишень для разработки противоопухолевых препаратов, в том числе и на основе природных соединений [32]. Сесквитерпеновые лактоны обладают активностью в качестве ингибиторов HDACs. Так, в работе [33] показана эффективность партенолида в отношении HDAC1, которая является супрессором ингибиторов p21<sup>WAF1/CIP1</sup> и p27<sup>KIP1</sup> циклин-зависимых киназ, в норме подавляющих

пролиферацию клеток. (Следует отметить, что партенолид проявляет активность только в отношении HDAC1, в отношении деацетилаз других классов он не эффективен.)

Известно, что канцерогенез происходит в гипоксическом микроокружении. При этом метаболизм опухолевых клеток переключается на анаэробный гликолиз, что отличает трансформированные клетки от их нормальных предшественников и определяет основу для создания средств с избирательной по отношению к раковым клеткам токсичностью [34]. Данное адаптивное приспособление обеспечивает выживаемость и устойчивость к апоптозу опухолевых клеток [35–37]. Гликолиз контролируется активностью трех ключевых аллостерических ферментов: гексокиназы (HK), фосфофруктокиназы (PFK) и пируваткиназы (PK). На начальном этапе глюкоза фосфорилируется HK, которая имеет четыре изоформы: в клетках опухолевых тканей преобладает гексокиназа III, с более высоким, чем у гексокиназы II, сродством к глюкозе [38]. PFK является вторым важным ферментом, способным модулировать процесс гликолиза и перспективной мишенью для поиска эффективных противоопухолевых препаратов. Активность PFK, которая катализирует необратимое MgATP-зависимое фосфорилирование фруктозо-6-фосфата с образованием фруктозо-1,6-бисфосфата, имеет решающее значение для определения скорости гликолитического потока [39, 40]. При высокой внутриклеточной концентрации  $Ca^{2+}$  связывание кальмодулина с высокоаффинным участком мономера PFK стабилизирует димерную форму PFK с полной активностью. Когда внутриклеточная концентрация  $Ca^{2+}$  низкая, кальмодулин диссоциирует с сайтов PFK, и димерная форма фермента становится частично активной. Ингибирование и активация PFK осуществляются путем модуляции между частично активной димерной формой и полностью активной тетрамерной формой. Фосфорилирование тетрамерной формы приводит к стабилизации PFK, и фермент становится менее восприимчивым к ингибированию АТФ. Такое фосфорилирование увеличивает связь тетрамера PFK с f-актином, который полностью активирует фермент. С другой стороны, ассоциация с микротрубочками тубулина стабилизирует димерную форму PFK, такая ассоциация инги-

бируется действием стабилизатора микротрубочек паклитаксела [41]. Для ряда природных соединений показано ингибирование поглощения глюкозы и производства лактата [42], что коррелирует с сокращением образования АТФ и, в конечном счете, вызывает апоптоз [43]. Сообщается также о снижении жизнеспособности клеток MCF-7 путем прямого ингибирования активности ПФК [44]. РК катализирует заключительную стадию гликолиза, дефосфорилирование фосфоенолпирувата, с выделением пирувата и АТФ и аллостерически регулируется промежуточным продуктом фруктозо-1,6-бисфосфатом. Увеличение поглощения глюкозы клетками опухоли напрямую коррелирует с ее агрессивностью [45].

При неопластическом процессе происходит также нарушение способности митохондрий активировать процессы митоптоза, апоптоза и т.д., т.е. процессов, ассоциированных с открытием митохондриальных пор перехода проницаемости [46] и высвобождением проапоптотических факторов, в частности цитохрома С. Для ряда опухолевых клеточных линий показаны гиперполяризация митохондриальной мембраны [47] по сравнению с нормальными клетками [48], а также различные изменения уровня активных форм кислорода (АФК). Снижение поступления пирувата, по-видимому, приводит к снижению продукции АФК и закрытию редокс-зависимых каналов, к митохондриальной гиперполяризации и, как следствие, к устойчивости к апоптозу. В соответствии с изложенным выше, перспективным путем создания противоопухолевых лекарственных средств является сочетание в одной молекуле различных компонентов, способных блокировать процесс гликолиза, изменять редокс-статус и влиять на функциональное состояние митохондрий как ключевого звена запуска апоптотического каскада гибели клетки, т.е. деполаризовать митохондрии и/или снижать их устойчивость к индукции открытия митохондриальных пор перехода проницаемости.

Перспективным направлением использования природных сесквитерпеновых лактонов является их направленная химическая модификация путем трансформации углеродного скелета, введения функциональных групп, получение гибридных молекул с фармакофорными фрагментами и т.д. Целью таких модификаций

является увеличение растворимости, улучшение фармакокинетических и фармакодинамических параметров, увеличение биологической активности, таргетирование к определенной молекулярной мишени. В настоящее время существует ряд примеров, подтверждающих успешность такого подхода. Одним из перспективных направлений химической модификации сесквитерпеновых лактонов является получение их аддуктов с аминокислотами. Так, в работе [49] описан синтез аддукта изохеленина с пролином. В работе [50] получены аддукты сесквитерпенового лактона людартина с рядом первичных, вторичных алифатических и ароматических аминов. Показана высокая избирательность таких соединений в отношении некоторых линий опухолевых клеток. Так, один из аддуктов был избирательно эффективен в отношении линии клеток А-549 с концентрацией полуингибирования ( $IC_{50}$ ), равной 2.6  $\mu M$ . Интересные результаты были получены при синтезе гибридных молекул на основе партенолида и известных препаратов — мелфалана (противоопухолевого препарата) и цитарабина (антиметаболита, применяемого при лечении острой миелоидной лейкемии и лимфоцитарной лейкемии) [51]. Полученные аддукты оказались более эффективны, чем исходные препараты, и имели  $IC_{50}$  в диапазоне от 0.2 до 5.2  $\mu M$ .

Таким образом, в настоящее время сесквитерпеновые лактоны рассматриваются как перспективный класс природных соединений, предназначенных для рационального мишень-ориентированного синтеза на их основе потенциальных противоопухолевых препаратов с мульти-таргетным действием. Целью данной работы является представление собственных результатов авторов в этой области медицинской и биоорганической химии.

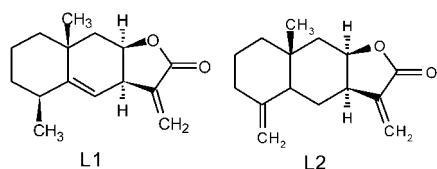
## **2. Выделение сесквитерпеновых лактонов из растений семейства сложноцветных (Asteraceae)**

Нами был исследован ряд природных сесквитерпеновых лактонов растений семейства сложноцветных (Asteraceae). Выделенные из растительного сырья соединения были использованы в качестве скаффолдов для разработки потенциальных антинеопластов, активных в отношении ряда молекулярных мишеней, значимых для

патогенеза опухолевых клеток и обладающих выраженными проапоптотическими свойствами. Особую группу составляли сесквитерпеновые лактоны, содержащие активированную экзометиленовую группу в лактоном цикле, на основе которых были синтезированы аддукты с фармакофорными аминами и известными противоопухолевыми препаратами. В начале работы из растений семейства сложноцветных был выделен ряд исходных сесквитерпеновых лактонов. Структуру соединений устанавливали на основании анализа их спектров ЯМР (включая двумерные эксперименты), масс-спектров высокого разрешения и сравнения констант с литературными данными.

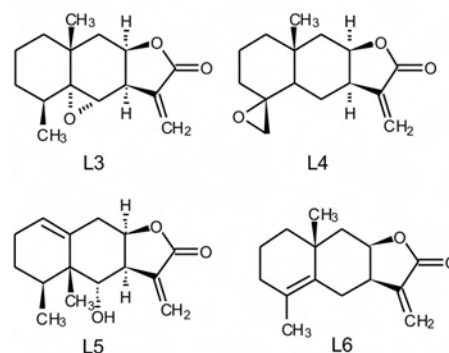
### 2.1. Девясил высокий (*Inula helenium* L.)

Из корней растения *I. helenium* по методике, включающей экстракцию измельченного сырья хлороформом и последующее хроматографирование на колонке с SiO<sub>2</sub>, была выделена смесь алантолактона (L1) и изоалантолактона (L2) в соотношении 1:1 наряду с несколькими минорными сесквитерпеновыми лактонами, также имеющими структуру звесманового типа [52].



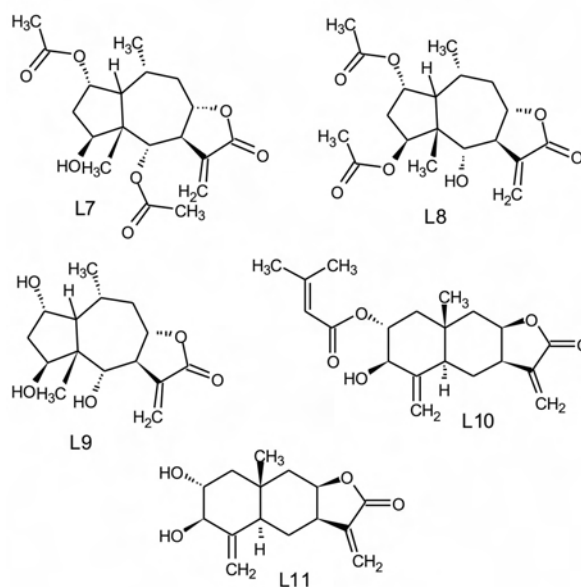
Фракции, содержащие лактоны L1 и L2, упаривали и кристаллизовали (2–3 раза) из 70%-ного водного метанола, в результате чего было выделено около 25% (от общего содержания в экстракте) индивидуального изоалантолактона. Дальнейшее разделение изомеров проводили на колонке с силикагелем, импрегнированном 10% AgNO<sub>3</sub>, используя в качестве элюента ступенчатый градиент бензола в легком петролейном эфире. Выделенные в результате хроматографирования на импрегнированной серебром колонке вещества содержали примесь серебра (2–5%, по данным элементного анализа), от которого избавлялись, пропуская их раствор в бензоле через слой нейтральной окиси алюминия 1-ой степени активности. Содержание этих двух лактонов в растении составляет 3–6% от сухого веса. В качестве минорных соединений были выделены эпоксиалантолактон (L3), эпокси-

сиизоалантолактон (L4), эремофиланолид L5 и аллоалантолактон (L6).



### 2.2. Девясил британский (*Inula britannica* L.)

Из хлороформенного экстракта надземной части растения *I. britannica* в качестве основного сесквитерпенового лактона был выделен британин (L7) (содержание в сырье до 0.5% от веса сухого сырья) и в качестве минорных компонентов — лактоны гваяновского типа: иннучиненолид С (L8), дидезацетилиннучиненолид С (L9), 2 $\alpha$ -сенециоилокси-3 $\beta$ -гидроксиизоалантолактон (пульхеллин F) (L10) и пульхеллин С (L11).

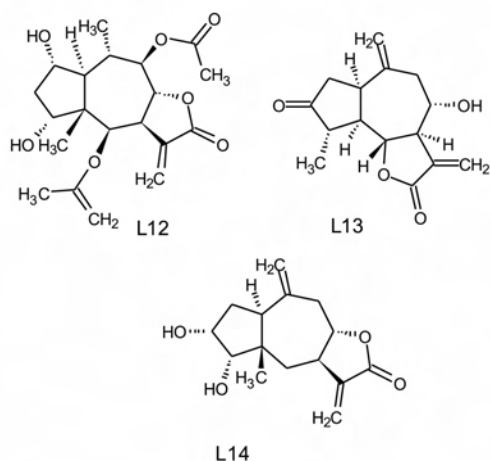


Структуры соединений соответствовали литературным данным [25].

### 2.3. Гайлардия крупноцветковая (*Gaillardia grandiflora* Hort. ex Van Houtte)

В качестве основного сесквитерпенового лактона из хлороформенного экстракта надземной части растения *Gaillardia grandiflora* был выделен псевдогваянолид спатулин (L12) (содержание до

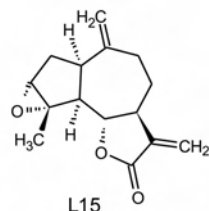




0.6% от веса сухого сырья), а в качестве минорных лактонов — гвайанолид гроссгемин (**L13**) и не описанный ранее сесквитерпеновый лактон **L14**.

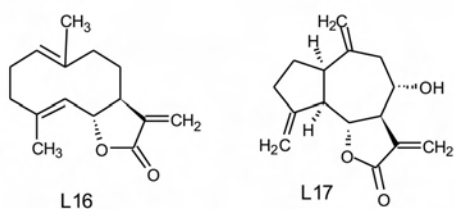
#### 2.4. Тысячелистник благородный (*Achillea nobilis* L.)

Из хлороформного экстракта надземной части растения *A. nobilis* был выделен сесквитерпеновый лактон эстафиатин (**L15**), содержание которого достигало 0.06 % от веса сухого сырья.



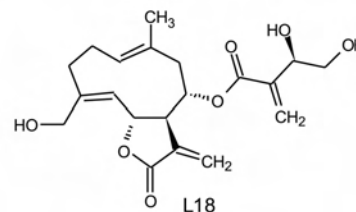
#### 2.5. Соснуря лопуховидная (*Saussurea lappa* L.) и лавр благородный (*Laurus nobilis* L.)

Для экстракции корней растения *Saussurea lappa* использовали бензол. В качестве основных сесквитерпеновых лактонов из такого экстракта были выделены костунолид (**L16**) (содержание до 0.95% от веса сухого сырья) и дегидрокостулактон (**L17**) (до 1.75%). Костунолид был также выделен из бензольного экстракта растения *Laurus nobilis* L., его содержание составляло до 0.7% от веса сухого сырья.



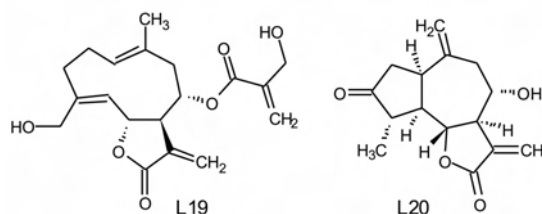
#### 2.6. Василек ложнопятнистый (*Centaurea pseudomaculosa* Dobroc.) и книккус благославенный (*Cnicus benedictus* L.)

Кницин (**L18**) (содержание до 1.95% от веса сухого сырья), лактон гермакранового типа, был получен из хлороформного экстракта надземной части растения *Centaurea pseudomaculosa* и из хлороформно-метанольного экстракта волчеца кудрявого (книккуса благославенного, *Cnicus benedictus* L.), содержание в котором составляло 1.5%.



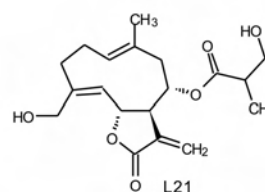
#### 2.7. Василек шероховатый (*Centaurea scabiosa* L.)

В качестве основного сесквитерпенового лактона из надземной части растения василёк шероховатый был выделен гермакранолид цинаропикрин (**L19**) (содержание до 0.3% от веса сухого сырья) и гвайанолид гроссгемин (**L20**) (в количестве 0.1%).



#### 2.8. Лопух большой (*Arctium lappa* L.).

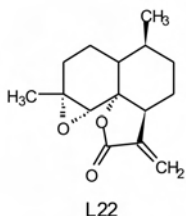
Из надземной части лопуха большого был выделен гермакранолид арктиопикрин (**L21**) в качестве основного сесквитерпенового лактона (содержание до 0.4% от веса сухого растения).



#### 2.9. Полынь однолетняя (*Artemisia annua* L.)

Артеаннуин (**L22**) — лактон с необычным сочленением циклов — был выделен в количестве до

0.4% от сухого веса из надземной части растения полыни однолетней в качестве основного сесквитерпенового лактона.



Таким образом, нами был исследован химический состав ряда растений семейства Сложноцветных, выделены и идентифицированы сесквитерпеновые лактоны, ряд лактонов наработан в препаративных количествах. В результате

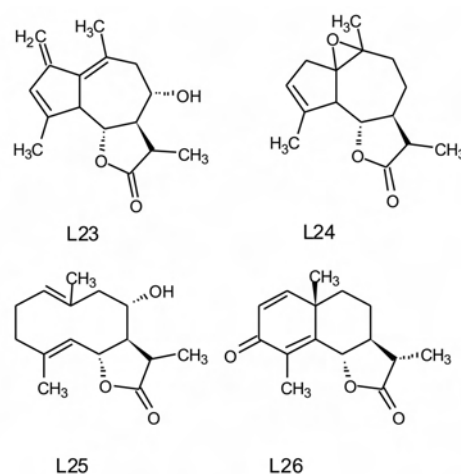
получен достаточно большой ряд природных сесквитерпеновых лактонов, предназначенных для химической модификации и биологического тестирования.

### 3. Химическая модификация скелета природных сесквитерпеновых лактонов

#### 3.1. Превращение лактонов, не содержащих активированную экзометиленовую группу, — синтез дегидросантонина

Среди большого разнообразия природных сесквитерпеновых  $\gamma$ -лактонов, выделяемых из растений семейства *Asteraceae*, встречаются соединения, содержащие в лактонном цикле не метиленовую, а метильную группу. Это, например, аустрицин (L23), компонент полыни белой (*Artemisia leucodes Schrenk*) и полыни австрийской (*A. austriaca Jacq.*); арборесцин (L24), найденный в *A. Arborescens*; балханолит (L25) [53], присутствующий в тысячелистниках (*A. millefolium L.*, *A. balchanorum H. Krasch*), а также сантонин (L26), обнаруженный во многих видах полыни.

Такие сесквитерпеновые лактоны, содержащие метильную группу в лактонном цикле, присутствуют в растениях в больших количествах и могут представлять собой перспективные скаффолды для модификации при создании в молекуле нового реакционного центра — активированной экзоциклической двойной связи, которая легко реагирует с нуклеофильными реагентами. На примере  $\alpha$ -сантонина (L26) мы продемон-



стрировали потенциальную возможность создания такой метиленовой группы в лактонном цикле.

Для формирования в молекуле сантонина экзоциклической двойной связи нами был выбран двухстадийный метод избирательного дегидрирования  $\alpha$ -метил- $\gamma$ -лактонного фрагмента. Он включал образование фенилселенозамещенного сантонина (L27) и его последующее окисление пероксидом водорода в уксусной кислоте [54]. В результате этих превращений образуется дегидросантонин (L28) (схема 1).

#### 3.2. Изомеризация производных алантолактона под действием кислот

##### 3.2.1. Эпоксидирование пероксикислотами

Алантолактон (L1), изоалантолактон (L2) и аллоалантолактон (L6) были введены в реакцию эпоксидирования пероксикислотами (перуксусной, трифторпероксиуксусной, *m*-хлопероксибензойной) по несопряженным двойным связям [52, 55–56]. Превращение происходит при комнатной температуре в течение 1–7 сут в зависимости от структуры исходного соединения (наиболее реакционноспособным в этом превращении оказался алантолактон (L1)). Соответствующие эпоксипроизводные L3, L4 и L29 образуются с количественным выходом.

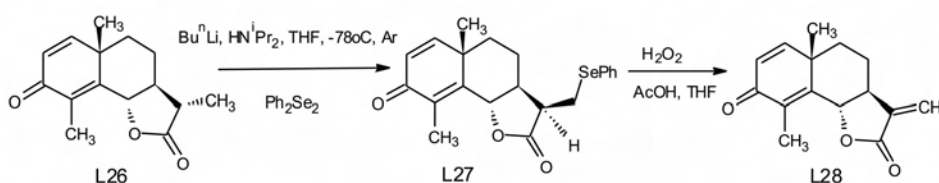
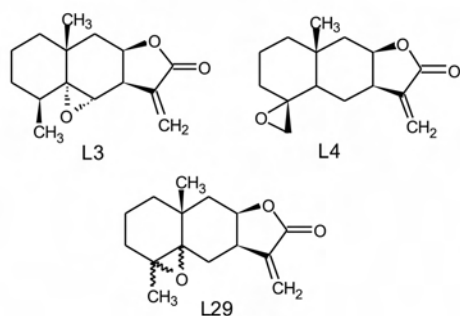


Схема 1



Реакция эпексидирования лактонов **L1** и **L2** перексусной кислотой стереоспецифична, т.е. образуется один пространственный изомер, а в случае эпексиданта **L29** получается смесь эпимеров в соотношении 3:2. Из этой смеси многократной перекристаллизацией удается выделить мажорный изомер, для которого с помощью РСА была установлена  $\alpha$ -ориентация эпексидного атома кислорода [57] (рис. 1).

### 3.2.2. Раскрытие оксиранового цикла в кислотной среде

Нами были предприняты попытки раскрыть эпексидный цикл в эпексидпроизводных **L3**, **L4** и **L29**. Известно [58], что лактоны, содержащие эпексигруппу, в условиях кислотного катализа обычно превращаются в диолы. Однако мы показали, что эпексидантолактон **L3** в различных кислотных условиях (кипячение в водном растворе щавелевой кислоты, перемешивание при комнатной температуре в водном ацетоне в присутствии трифторуксусной, серной или хлорной кислот) образует в качестве основного продукта исключительно спирт **L5**. Сложный эфир (формиат) этого спирта был получен в работе [59] при обработке эпексиданта **L3** муравьиной кислотой в ацетоне. Следует отметить, что данная реакция является примером преобразования лактонного скелета эвдесманового типа в эремофилановый.

Наилучший выход продукта **5** (~50%) был достигнут при 5-часовом кипячении субстрата с трехкратным избытком щавелевой кислоты. После обработки реакционной смеси соединение **L5** было выделено в виде крупных

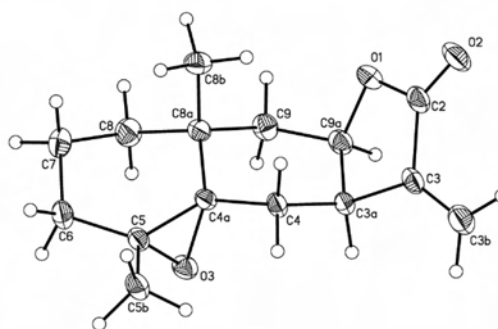
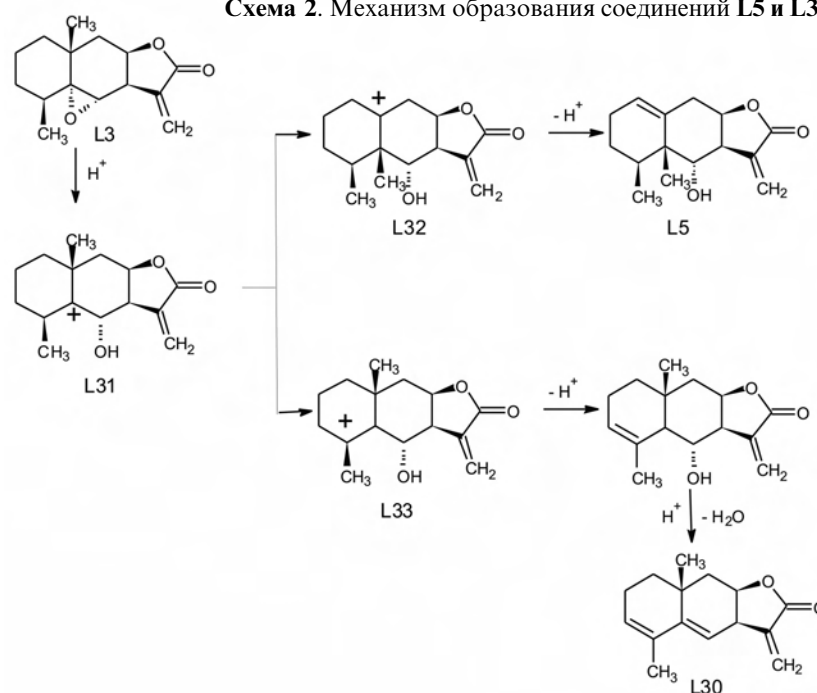


Рис. 1. Общий вид эпексидантолактона (**L29**) по данным рентгеноструктурного анализа в представлении неводородных атомов вероятностными эллипсоидами атомных смещений ( $p = 50\%$ ).

прозрачных кристаллов (перекристаллизовано из бензола с гексаном). При очистке этого соединения колоночной хроматографией на силперле (элюент — бензол) нами был обнаружен побочный продукт этой реакции (выход 13%) — сопряженный диеновый лактон **L30**. Образование соединений **L5** и **L30** в данной реакции может быть объяснено следующей последовательностью превращений (схема 2).

Можно предположить, что при протонировании эпексидантолактона **L3** происходит раскрытие оксиранового цикла с образованием катиона **L31**, который может перегруппировываться двумя путями. В первом случае происходит миграция метильной группы из положения 10 лактона в положение 5 по типу известной

Схема 2. Механизм образования соединений **L5** и **L30**



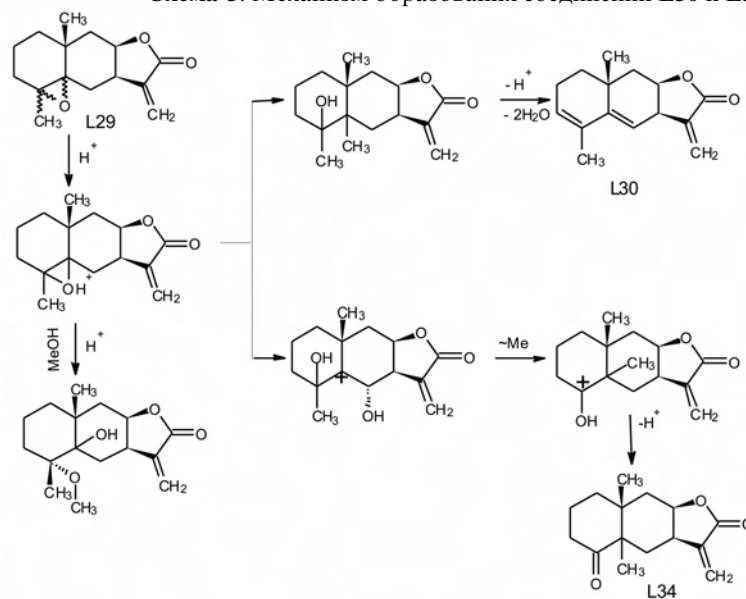
перегруппировки типа Вагнера–Мейервейна. Катион **L32** стабилизируется путем выброса протона из положения 1 лактона, и образуется двойная связь при атомах С-1 и С-10 (соединение **L5**). Отрыва протона из положения 9 молекулы не происходит, по-видимому, из-за наличия кислородного заместителя при атоме С-8 и, как следствие этого, повышенной СН-кислотности 9-CH<sub>2</sub>-группы. Строение соединения **L5** установлено на основании анализа спектров ЯМР и масс-спектров высокого разрешения. В катионе **L31** может мигрировать и гидрид-ион от атома С-4, приводя к катиону **L33**. При депротонировании катиона С образуется соответствующий промежуточный спирт (зафиксирован в реакционной смеси с помощью спектроскопии ЯМР <sup>1</sup>H), который далее дегидратируется до сопряженного диена **L30**.

Диен **L30** в препаративных количествах удобнее получать из другого эпоксипроизводного — в аналогичных условиях это основной продукт (выход 56%) раскрытия эпoxidного цикла в соединении **L29**. По-видимому, в процессе превращения происходит гидролиз эпоксида и двойная дегидратация образующегося диола. Как и в случае эпоксида **L3**, реакция протекает неселективно. Параллельно эпоксипроизводное **L29** изомеризуется в кетон **L34** (выход 24%). Образование последнего можно объяснить миграцией метильной группы в положение 5 из соответствующего промежуточного карбокатиона с отщеплением протона от протонированного атома кислорода карбонильной группы (схема 3).

### 3.3. Получение эремофиланов из алантолактона

Алантолактон содержит двойную связь в  $\gamma$ -положении по отношению к карбонильной группе, вследствие чего можно ожидать, что это соединение способно вступать в реакции перелактонизации с образованием нового пятичленного лактонного цикла. Однако при попытке провести иодлактонизацию вместо ожидаемого соединения **L35**, сохраняющего эвдесмановый скелет, в каче-

Схема 3. Механизм образования соединений **L30** и **L34**



стве основного продукта реакции был выделен эремофиланолид **L36** (схема 4). По-видимому, первоначально образующееся иодпроизводное **33** элиминирует HI с миграцией метильной группы по карбокатионному типу [60].

### 3.4. Получение сесквитерпеновых лактонов с диеновой группой

Сесквитерпеновые лактоны с диеновой группой представляют интерес как потенциальные скаффолды для синтеза различных производных лактонов. Однако в растениях они содержатся в минорных количествах, за исключением сантонина (**L26**). На примере лактонов изотелекина (**L37**) и энцелина (**L38**) мы показали возможность получения лактонов с диеновой группой из доступного изоалантолактона (**L2**) в несколько стадий. На первой стадии происходит аллильное окисление лактона изоалантолактона диоксидом селена с образованием изотелекина (**L37**) с количественным выходом. Для окисления аллильного спирта изотелекина в енон требуется ис-

Схема 4. Синтез эремофилана **L36** из алантолактона

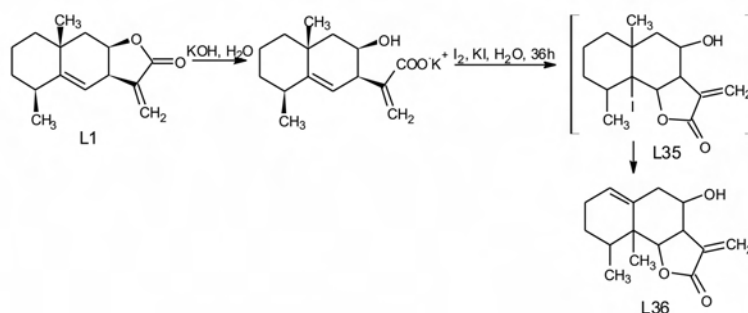
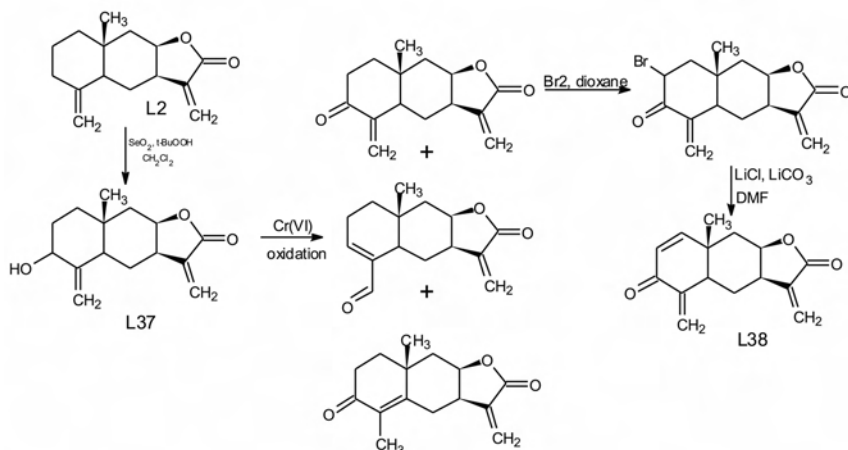


Схема 5. Получение сесквитерпенового лактона **L38** с диеновой группой

пользование в качестве окислителя соединения хрома(VI), на этой стадии в качестве побочных продуктов образуются также и другие лактоны, от которых очищают целевой лактон с помощью хроматографии. На следующей стадии енон бромуют в диоксане, затем отщепляют HBr под действием солей лития, в результате происходит замыкание двойной связи с образованием целевого диенона (**L38**) (схема 5).

### 3.5. Синтез телекина из изоалантолактона

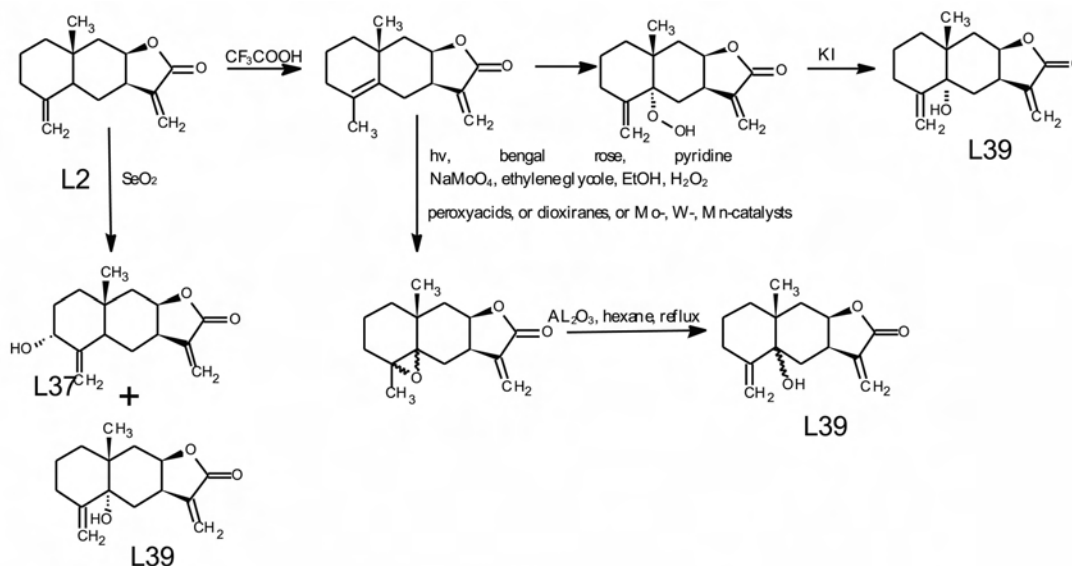
Телекин (**L39**) — ближайший аналог изоалантолактона (**L2**), в его структуре присутствует гидроксильная группа. Этот лактон обладает широким спектром биологической активности и может быть получен в препаративных количествах из изоалантолактона (схема 6).

Изоалантолактон (**L2**) содержит экзометиленовую группу в декалиновом цикле и способен окисляться при действии диоксида селена в аллильный спирт. В этой реакции возможно образование двух лактонов. Однако, как показали исследования, преимущественно получается один из них — лактон изотелекин (**L37**), его изомер по положению спиртовой группы телекин (**L39**) образуется как второй

продукт реакции лишь в определенных условиях. В природных источниках эти лактоны также присутствуют как минорные компоненты. Было исследовано три метода препаративного синтеза телекина из изоалантолактона (схема 6).

В первом случае было использовано прямое окисление изоалантолактона (**L2**) оксидом селена в различных условиях. В этом способе основным продуктом является изотелекин (**L37**), а выход целевого телекина (**L39**) составляет лишь < 20%.

Второй подход — реакция с участием синглетного кислорода. Для инициирования этой реакции проводят миграцию двойной связи декалинового цикла в изоалантолактоне в *эндо*-положение путем выдерживания в среде хлороформа с трифторуксусной кислотой. В результате данной

Схема 6. Получение телекина **L39** из изоалантолактона

стадии с количественным выходом образуется аллоалантолактон (**L6**). Наиболее эффективным способом генерации синглетного кислорода оказалось облучение потока воздуха видимым светом в присутствии фотосенсибилизатора (бенгальского розового) в безводном пиридине. Присутствующий в среде лактон быстро реагирует с образованием соответствующего гидропероксида, который может быть выделен хроматографически и затем реакцией с иодидом калия превращен в соответствующий спирт. Также эффективным оказалось использование «темновой» генерации  $^1\text{O}$  путем каталитического разложения пероксида водорода молибдатом натрия. Однако в этом случае реакция осложняется частичным присоединением спиртов по экзо-метиленовой группе лактонного цикла.

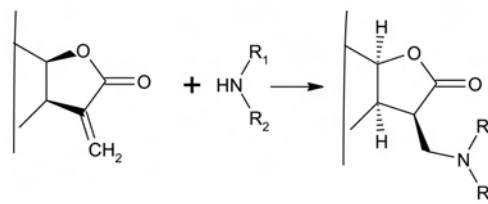
Третий способ — парциальное окисление эндоциклической двойной связи с образованием эпоксида и последующее раскрытие оксиранового цикла. Наиболее приемлемым реагентом для этой реакции оказался оксид алюминия. Телекин (**L39**) по этому способу может быть получен при длительном кипячении в гексане. Однако в результате реакции образуется смесь стереоизомеров эпоксида, из которой можно получить только смесь телекина (**L39**) и его эписмера. Они имеют практически одинаковую хроматографическую подвижность, что делает невозможным их разделение хроматографическим методом.

#### 4. Аминопроизводные сесквитерпеновых лактонов

##### 4.1. Реакции сесквитерпеновых лактонов с аминами

Наличие в структуре  $\gamma$ -лактонов активированной  $\alpha$ -метиленовой группы позволяет вводить такие соединения, например, в реакции Михаэля, в которых нуклеофильным агентом является первичный или вторичный алифатический амин (схема 7). При введении аминов в реакции с разными сесквитерпеновыми лактонами было обнаружено, что наиболее легко процесс протекает в случае вторичных аминов. С целью получения продуктов с улучшенной или измененной биологической активностью из лабораторной коллекции соединений нами был выбран ряд фармакофорных вторичных и первичных аминов. Предпочтение отдавалось аминам,

Схема 7. Аза-реакция Михаэля с участием сесквитерпеновых лактонов и аминов



фрагменты которых входят в состав лекарственных препаратов (производные пиперидина и пиперазина **1–7**) или которые сами являются природными алкалоидами (например, алоперин (**8**)) [25, 54, 61–64]. Примеры структур вторичных аминов представлены в табл. 1.

Таблица 1. Реагенты для аза-реакции Михаэля с участием сесквитерпеновых лактонов.

Амин	Структура	Амин	Структура
<b>1</b>		<b>7</b>	
<b>2</b>		<b>8</b>	
<b>3</b>		<b>9</b>	
<b>4</b>		<b>10</b>	
<b>5</b>		<b>11</b>	
<b>6</b>		<b>12</b>	

Продукты на основе пиперазинов **1–5**, замещенных по второму атому азота этокси- и 2-фурилкарбонильными группами, арильными или гетарильными (пиридиновыми) фрагментами, как правило, выпадают в виде осадка из реакционной смеси. Также не представляло трудностей выделение продуктов присоединения производных пиперидина **6–10**, несмотря на то, что среди них находились соединения с объемными заместителями. Таким образом, производные пиперазина и пиридина оказались наиболее приемлемыми объектами как с точки зрения продолжитель-

ности реакции, так и в связи с легкостью выделения образующихся продуктов присоединения.

Аналогичные продукты взаимодействия сесквитерпеновых лактонов с первичными аминами (например, соединениями **11**, **12**) были получены с меньшими выходами при более продолжительном перемешивании реагентов. В то же время ароматические амины не вступали в данную реакцию, вероятно, вследствие пониженной нуклеофильности.

Взаимодействие сесквитерпеновых лактонов с аминами протекало в мягких условиях — при перемешивании реагентов при комнатной температуре в полярном растворителе — метаноле. Степень конверсии исходного лактона контролировали методом ЯМР  $^1\text{H}$  (исчезновение сигналов протонов экзометиленовой группы в области 4–5 м.д.).

Установлено, что в реакциях сесквитерпеновых лактонов с аминами стереоселективно образуются продукты присоединения нуклеофила по экзоциклической двойной связи лактона. Среди лактонов наиболее легко реагируют с аминами изоалантолактон (**L2**) и его эпоксид (**L4**), другие лактоны оказались менее активными и сравнимыми по реакционной способности.

В результате была получена довольно большая библиотека соединений ( $> 200$ ) **L<sub>n</sub>-m**, содержащих два фармакофорных фрагмента — сесквитерпенового лактона (**L<sub>n</sub>**) и соответствующего амина (**m**).

Структура впервые полученных аминопроизводных была установлена с использованием комплекса физико-химических методов: ИК-спектроскопии, спектроскопии ЯМР и масс-спектрометрии. В ИК-спектрах зафиксированы колебания аминогруппы (для первичных аминов) в области  $3300\text{ см}^{-1}$ , лактонной карбонильной группы — около  $1760\text{ см}^{-1}$ . В спектрах ЯМР  $^1\text{H}$  зафиксированы сигналы появляющихся в продуктах протонов: соответствующего аминного фрагмента, при атоме C-3 (в области 2.8–3.0 м.д.) и  $\text{CH}_2\text{N}$ -группы (в области 2.8–3.0 м.д.). Сигналы остальных протонов исходного соединения сохраняются (за исключением протонов экзоциклической  $\text{CH}_2$ -группы пятичленного цикла в области  $\sim 6.18$  и  $\sim 5.54$  м.д.), что соответствует предложенным структурам. Стереоконфигурация нового асимметрического центра — атома C-3 — установлена на основании

двумерных экспериментов NOESY. Масс-спектры высокого разрешения подтверждают брутто-формулу продуктов аминирования и содержат интенсивные пики молекулярного иона.

#### 4.2. Стереохимия аза-реакции Михаэля с участием сесквитерпеновых лактонов

При введении в аза-реакцию Михаэля хиральных молекул большое значение имеет ее стереохимический результат. В условиях таких превращений с участием сесквитерпеновых лактонов сохраняются содержащиеся в молекуле хиральные центры и появляется новый асимметрический атом углерода C-3. На примере продукта аминирования алантолактона (**L1**) и амина **6** — производного (**L1-6**) — мы установили абсолютную стереоконфигурацию нового асимметрического центра [65]. Эксперименты двумерной спектроскопии  $^1\text{H}$ – $^1\text{H}$  NOESY позволили выявить близко расположенные протоны, а PCA монокристаллов подтвердил предложенную структуру.

Так, в спектре ЯМР  $^1\text{H}$  соединения **L1-6** были зафиксированы сигналы протонов экзометиленовой группы в положении при 4.40 и 4.77 м.д. в виде дублетов с константой 1.2 Гц, сигнал  $\text{CH}_3$ -протонов при C-8a в виде синглета в области 0.80 м.д. и характерный слабополюсный сигнал протона при C-9a в области 4.49 м.д. в виде триплета дублетов (KCCB составляли 4.7 и 1.6 Гц), а также сигналы протонов ароматического кольца и  $\text{CH}_3\text{O}$ -групп аминного фрагмента. Корреляции вицинальных взаимодействий протонов и NOE-корреляции в эксперименте NOESY представлены на рис. 2.

Аналогично был проанализирован спектр ЯМР  $^1\text{H}$  соединения **L2-12**. В молекуле изоалантолактона (**L2**) протон при атоме C-9a имеет  $\alpha$ -ориентацию, как и протон в положении 3a, что

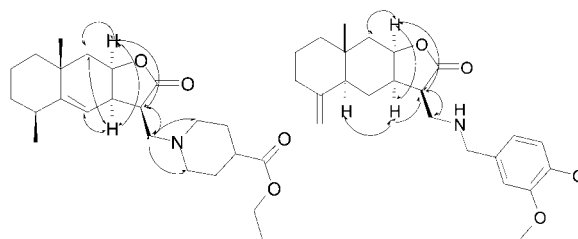


Рис. 2. Структурно-значимые корреляции NOE для аминопроизводных **L1-6** и **L2-12**.

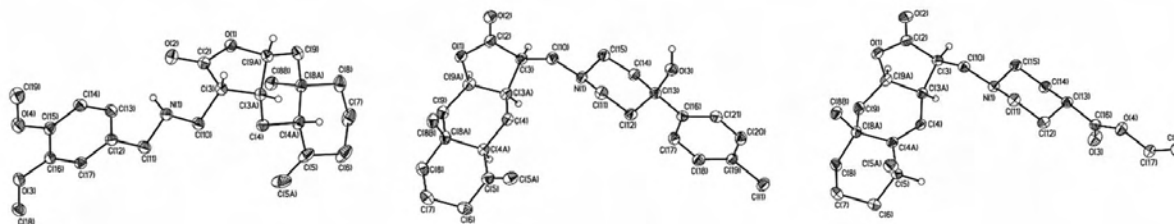


Рис. 3. Структура продуктов аминирования **L1-6**, **L1-7** и **L2-12** в представлении неводородных атомов вероятностными эллипсоидами атомных смещений ( $p = 50\%$ ).

экспериментально подтверждается небольшой константой спин-спинового взаимодействия ( $^3J_{H-3a, H-9a} = 1.6$  Гц) и свидетельствует о *цис*-сочленении лактонного и декагидронафталинового циклов. В спектре NOESY соединения **L2-12** были зарегистрированы отчетливые NOE-корреляции между парами протонов, а именно: H-9a и H-3a, H-9a и H-3, H-9a и H<sub>eq</sub>-9 и H-9a и H<sub>ax</sub>-9. Для протона при атоме C-3a имеются выраженные корреляции с  $\alpha$ -ориентированным протоном при атоме C-4a и протоном при атоме C-3. Следовательно, протоны H-9a, H-4a, H-3a и H-3 расположены по одну сторону гидрированной нафто[2,3-*b*]фуран-2-оной системы, т.е. аминометильный заместитель имеет  $\beta$ -конфигурацию (стереодескриптор *R*). (Отметим, что аналогичным способом были установлены стереоконфигурации нового асимметрического центра для других аминопроизводных.)

На рис. 3 приведены структуры молекул **L1-6**, **L1-7** и **L2-12** по данным PCA, которые подтверждают сделанные выше заключения.

Пространственное строение представленных выше аминометилпроизводных **L1-6**, **L1-7** и **L2-12** позволило сделать предположение о стереохимии аза-реакции Михаэля. Скорее всего, амин как N-нуклеофил присоединяется к двойной связи лактона, сопряженной с карбонильной группой (схема 8).

Образующийся енолят протонируется с *экзо*-стороны, в результате получается стерически наименее затрудненный и термодинамически более выгодный диастереомер с аксиальным ато-

мом водорода. Аминный фрагмент имеет псевдоэкваториальное расположение. Вследствие хиральности исходного лактона аза-реакция Михаэля с участием  $\gamma$ -ненасыщенных природных лактонов является стереоспецифичной. По-видимому, аналогичным образом происходит реакция производных алантолактона и с другими аминами. Следует отметить, что ни в одном из экспериментов нами не зафиксировано в реакционной смеси присутствия второго диастереомера продукта аминирования.

#### 4.3. Образование новой гетероциклической системы на основе эпоксиалантолактона и триптамина

Обнаружено [66], что в реакции эпоксиалантолактона (**L3**) с триптамином (**11**) процесс не останавливается на стадии присоединения амина по экзоциклической двойной связи лактонного цикла, а происходит раскрытие эпокси-группы и замыкание пирролидинового цикла (схема 9). В результате образуется не описанная ранее гетероциклическая система — замещенный гидрированный бензо[*g*]фуоро[4,3,2-*cd*]индолон (**L40**).

Процесс проводят в мягких условиях — при выдерживании эквимольных количеств реагентов при комнатной температуре в метаноле. Отметим, что реакция протекает стереоспецифично — образуется только один пространственный изомер. Строение полученного соединения **L40** установлено на основании спектральных данных (ИК-спектроскопии, спектроскопии ЯМР  $^1H$  и  $^{13}C$ , в том числе двумерных экспериментов COSY и NOESY). Окончательно структура продукта доказана с помощью PCA (рис. 4).

При более тщательном исследовании этой реакции удалось остановить ее на начальной стадии и

Схема 8. Стереохимия реакции присоединения амина к лактонному циклу

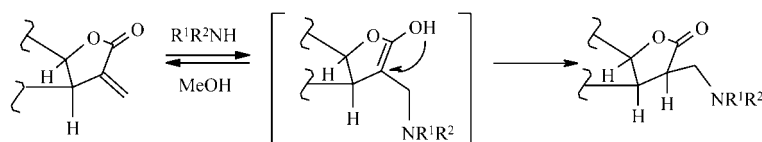
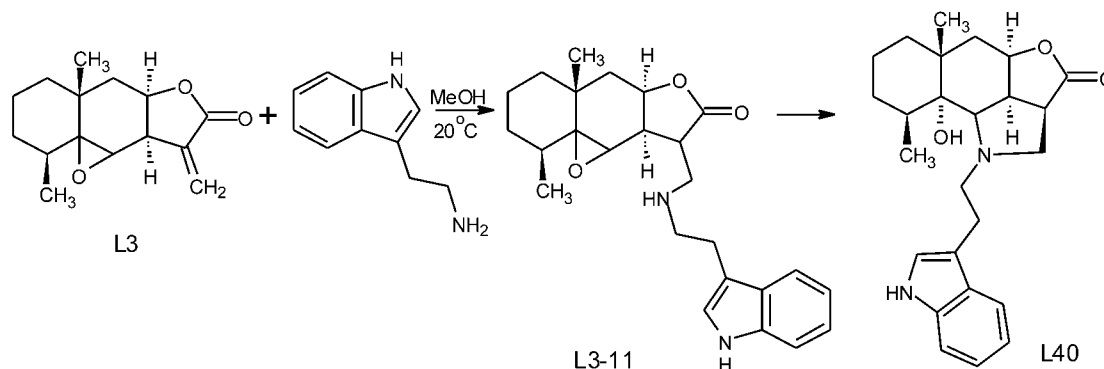




Схема 9. Образование гидрированного бензо[*g*]фууро[4,3,2-*cd*]индолона (**L40**)

выделить продукт присоединения триптамина — производное **L3-11** (выход 70%). При дальнейшем выдерживании в метаноле в течение суток он превращался в продукт двойного присоединения амина — бензо[*g*]фууро[4,3,2-*cd*]индолон **40** (выход 54%).

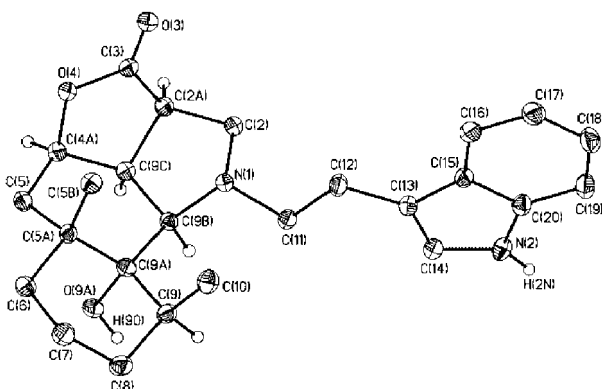


Рис. 4. Структура соединения **L40** в представлении неводородных атомов вероятностными эллипсоидами атомных смещений ( $\rho = 50\%$ ).

#### 4.4. Реакция эпоксиалантолактона с первичными аминами

Для исследования аза-реакции Михаэля с участием эпоксиалантолактона (**L3**) на предмет образования производных новой гетероциклической системы, описанной в предыдущем разделе, был взят ряд первичных аминов **11–19** (табл. 2).

Оказалось, что протекание такой реакции зависит от природы амина. Ароматические амины не реагируют с эпоксиалантолактоном, очевидно, вследствие своей пониженной нуклеофильности, а простые алифатические амины (как более сильные основания) образуют сложные смеси соединений, в которых методом ЯМР  $^1\text{H}$  зафиксированы продукты раскрытия лактонного

цикла. Хорошие результаты (непродолжительное время процесса и приемлемые выходы продуктов) были получены при введении в реакцию аминов, которые содержали дополнительный  $\pi$ -донорный фрагмент (бензольный или индольный цикл), отделенный от аминогруппы углеродородным мостиком. Наличие этих группировок способствовало гетероциклизации. Особенно легко протекало взаимодействие эпоксиалантолактона с аминами, содержащими в (гетеро)ароматическом ядре электронодонорную метоксигруппу. В результате реакции с аминами **12–19** во всех случаях были выделены производные гидрированных бензо[*g*]фууро[4,3,2-*cd*]индолонов **L41–L48** (схема 10).

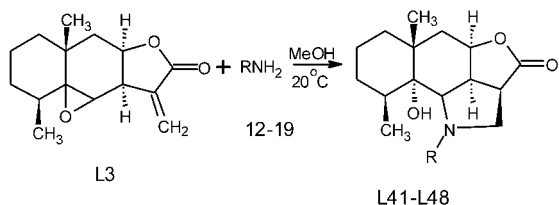
Теоретически возможны два пути образования производных такой гетероциклической системы, отличающихся последовательностью стадий присоединения амина, причем с учетом обратимости реакции присоединения по Михаэлю (схема 11).

Соотношение этих путей должно определяться скоростями соответствующих стадий. В пользу преимущественного протекания реакции по пути, *a* свидетельствуют как теоретиче-

Таблица 2. Структуры аминов для реакции с эпоксиалантолактоном (**L3**).

Амин	Структура	Продукт	Амин	Структура	Продукт
12		L41	16		L45
13		L42	17		L46
14		L43	18		L47
15		L44	19		L48

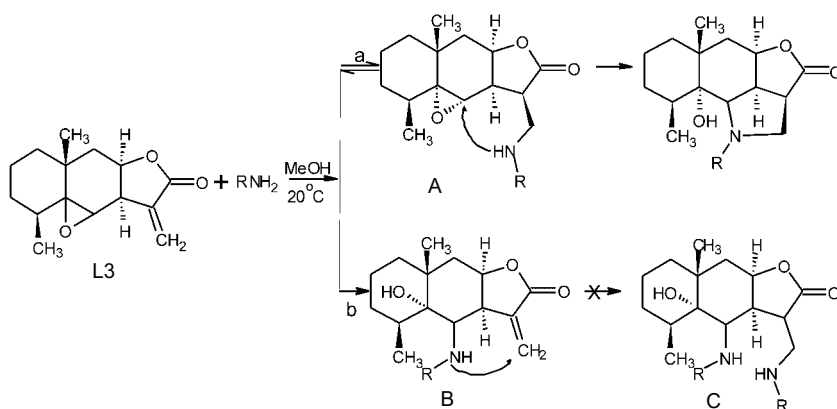
**Схема 10.** Образование гидрированного бензо[*g*]фууро[4,3,2-*cd*]индолона (**L40**)



ционных смесях не только зафиксированы, но и выделены и охарактеризованы.

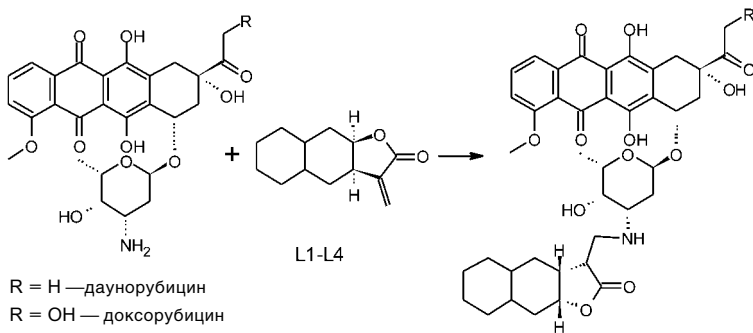
Очевидно, что нуклеофильность атома азота в исходном первичном амине ниже, чем таковая в соответствующем вторичном амине — аддукте Михаэля. По этой причине и скорость раскрытия оксиранового цикла при атаке аминogруппой аддукта больше, чем в случае исходного амина, что

**Схема 11.** Механизм образования гидрированных бензо[*g*]фууро[4,3,2-*cd*]индолонов **L40–L48**



также способствует реализации реакции по пути *a*. Следует отметить, что, кроме триптамина (**11**), соответствующий аддукт Михаэля **L3-16** был выделен нами, как и минорный продукт в реакции с 4-метоксифенетиламиноном (**16**). При введении в указанную реакцию других аминов сразу же происходила каскадная гетероциклизация, приводящая к образованию соответствующих гидрированных бензо[*g*]фууро[4,3,2-*cd*]индолонов.

**Схема 12.** Получение конъюгатов сесквитерпеновых лактонов и антрациклиновых антибиотиков



#### 4.5. Синтез конъюгатов антрациклиновых антибиотиков с сесквитерпеновыми лактонами

В качестве аминного компонента в аза-реакции Михаэля можно использовать антрациклиновые антибиотики даунорубин (DNR) и доксорубин (DOX), имеющие в своей структуре первичную аминogруппу. Конъюгаты сесквитерпеновых лактонов и антрациклиновых

антибиотиков образуются в мягких условиях [67], в ряде случаев основания из хлоргидратов антрациклинов получают *in situ* в присутствии основания — соды или поташа (схема 12). Таким образом, на основе природных сесквитерпеновых лактонов и их производных, в структуре которых сохраняется активированная экзометиленовая группа, был синтезирован ряд гибридных молекул. Такие молекулы сочетают в своей структуре два биологически активных фрагмента — сесквитерпенового лактона и фармакофорного амина, в том числе алкалоида, антрациклинового антибиотика или другого лекарственного препарата. Это сочетание дол-

гие факторы, так и практические результаты. Во-первых, у тризамещенного оксиранового фрагмента электрофильность и стерическая доступность для нуклеофильной атаки меньше, чем у активированной метиленовой группы. Во-вторых, при сравнении строения интермедиатов **A** и **B** видно, что внутримолекулярная атака аминометильного фрагмента на эпоксидное кольцо стерически предпочтительнее атаки аминоспиртового фрагмента на метиленовую группу. В-третьих, в продуктах реакции не обнаружены непредельные аминоспирты **B** и бисаминоаддукты **C** в заметных количествах, а аддукты Михаэля (интермедиаты **A**) в некоторых реак-

циях

жно привести как к усилению уже известных противоопухолевых свойств сесквитерпеновых лактонов, так и к появлению у гибридных молекул новых видов физиологической активности.

## 5. Противоопухолевая активность природных сесквитерпеновых лактонов и гибридных молекул на их основе

### 5.1. Цитотоксичность соединений в отношении линий опухолевых клеток

В качестве объектов для оценки цитотоксического действия природных сесквитерпеновых лактонов и их производных был использован ряд опухолевых клеточных линий, который составили адгезионные культуры аденокарциномы молочной железы (MCF7), меланомы кожи (MS), аденокарциномы толстого кишечника (HCT116), а также суспензионная культура клеток миелоидного лейкоза (K562) [25, 54, 61 – 64]. Клеточную жизнеспособность линий MCF7, MS и HCT116 определяли по МТТ-тесту [68], линии K562 — с использованием ресазурина [69].

Значения концентраций, вызывающих 50%-ное ингибирование роста популяции клеток ( $IC_{50}$ ), средние значения, средняя ошибка эксперимента и среднеквадратичные отклонения, а также определение статистически значимой достоверности различий между группами данных рассчитывались с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 7. Статистически значимыми считали различия по  $t$ -критерию Стьюдента  $p < 0.05$ . Все эксперименты проводились не менее чем в трех повторностях.

Изоалантолактон оказал приблизительно равное цитотоксическое действие в отношении всех трех адгезивных линий, в то время как его производные не показали значимого эффекта за исключением триптаминового конъюгата **L1-11**, который оказался наиболее токсичным (табл. 3).

Алантолактон **L1** и его производные показали в МТТ-тесте (МТТ — бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия) более высокую цитотоксическую активность, по сравнению с производными изоалантолактона, проявляя при этом и избирательность действия. Так, соединение **L1-8** оказалось почти в 2 раза токсичнее исходного лактона в отношении линии MS и в 3 раза токсичнее для клеток MCF7, а для клеток HCT116 активность сохранилась на том же уровне (табл. 4).

**Таблица 3.** Цитотоксичность изоалантолактона **L2** и его аминокпроизводных в отношении опухолевых клеточных линий ( $IC_{50}$ , мкМ).

Соединение	Клеточная линия		
	MCF7	MS	HCT116
<b>L2</b>	41.48 ± 0.03	44.38 ± 0.02	38.09 ± 0.03
<b>L2-1</b>	> 100	84.53 ± 0.02	68.05 ± 0.02
<b>L2-2</b>	> 100	81.9 ± 0.02	80.96 ± 0.02
<b>L2-3</b>	> 100	> 100	> 100
<b>L2-4</b>	> 100	> 100	> 100
<b>L2-5</b>	> 100	83.52 ± 0.03	> 100
<b>L2-8</b>	> 100	80.00 ± 0.02	89.27 ± 0.06
<b>L2-9</b>	> 100	> 100	> 100
<b>L2-11</b>	34.94 ± 0.01	23.11 ± 0.04	29.35 ± 0.02

**Таблица 4.** Цитотоксичность алантолактона **L1** и его аминокпроизводных в отношении опухолевых клеточных линий ( $IC_{50}$ , мкМ).

Соединение	Клеточная линия		
	MCF7	MS	HCT116
<b>L1</b>	33.01 ± 0.3	22.7 ± 0.03	12.92 ± 0.04
<b>L1-1</b>	48.73 ± 0.04	44.04 ± 0.04	45.59 ± 0.04
<b>L1-2</b>	71.23 ± 0.05	27.44 ± 0.03	71.25 ± 0.02
<b>L1-3</b>	67.63 ± 0.07	28.25 ± 0.04	55.15 ± 0.02
<b>L1-4</b>	> 100	> 100	> 100
<b>L1-5</b>	51.31 ± 0.04	46.00 ± 0.02	57.44 ± 0.04
<b>L1-8</b>	12.98 ± 0.03	13.84 ± 0.05	13.36 ± 0.06
<b>L1-9</b>	> 100	> 100	> 100
<b>L1-11</b>	20.92 ± 0.02	16.99 ± 0.02	26.06 ± 0.03

Продукты аминирования аллоалантолактона, за исключением соединения **L6-8**, не оказывают значимого эффекта на исследуемые клеточные опухолевые линии (табл. 5). Соединение **L6-8** проявляет умеренную активность, причем оно более токсично для клеток линии

**Таблица 5.** Цитотоксичность аллоалантолактона **L6** и его производных в отношении опухолевых клеточных линий ( $IC_{50}$ , мкМ).

Соединение	Клеточная линия		
	MCF7	MS	HCT116
<b>L6</b>	—	—	—
<b>L6-1</b>	> 100	66.23 ± 0.03	55.37 ± 0.03
<b>L6-2</b>	> 100	> 100	> 100
<b>L6-4</b>	> 100	> 100	> 100
<b>L6-5</b>	> 100	68.03 ± 0.03	70.29 ± 0.02
<b>L6-8</b>	78.52 ± 0.03	33.93 ± 0.06	38.11 ± 0.05
<b>L6-9</b>	> 100	> 100	> 100

**Таблица 6.** Токсичность эпоксиизоалантолактона **L4** и его аминокпроизводных в отношении опухолевых клеточных линий (IC<sub>50</sub>, мкМ)

Соединение	Клеточная линия		
	MCF7	MS	HCT116
<b>L4</b>	63.36 ± 0.04	42.98 ± 0.04	52.27 ± 0.03
<b>L4-1</b>	> 100	> 100	> 100
<b>L4-2</b>	> 100	> 100	> 100
<b>L4-3</b>	84.13 ± 0.08	71.90 ± 0.06	76.82 ± 0.02
<b>L4-8</b>	72.56 ± 0.06	65.06 ± 0.04	85.66 ± 0.06
<b>L4-10</b>	> 100	> 100	> 100
<b>L4-11</b>	> 100	> 100	> 100

HCT116. То же самое наблюдается и для эпоксиизоалантолактона **L4** (табл. 6), с несколько меньшей разницей в цитотоксичности для различных линий клеток.

Большинство аддуктов Михаэля с эпоксиалантолактоном (соединения **L3-1**–**L3-11**, **L3-16**) обладают выраженной цитотоксической активностью (табл. 7). Как показали результаты МТТ-теста, воздействие эпоксиалантолактоном (**L3**) в течение 48 часов ингибирует рост культур клеточных линий в дозозависимом виде, в то время как гирированные бензо[*g*]фуоро[4,3,2-*cd*]индолонны **L40**–**L48** не обладают заметной активностью. При этом активность аддуктов

**Таблица 7.** Цитотоксичность эпоксиалантолактона **L3**, его аминокпроизводных и соответствующих бензофуороиндолонны в отношении опухолевых клеточных линий (IC<sub>50</sub>, мкМ)

Соединение	Клеточная линия		
	MCF7	MS	HCT116
<b>L3</b>	29.25 ± 0.03	32.39 ± 0.04	13.88 ± 0.04
<b>L3-1</b>	34.00 ± 0.04	34.68 ± 0.04	28.01 ± 0.08
<b>L3-2</b>	37.25 ± 0.03	34.98 ± 0.05	34.72 ± 0.07
<b>L3-3</b>	38.74 ± 0.06	40.75 ± 0.05	24.40 ± 0.05
<b>L3-4</b>	61.13 ± 0.04	50.88 ± 0.04	38.03 ± 0.06
<b>L3-5</b>	35.74 ± 0.02	37.01 ± 0.05	22.48 ± 0.07
<b>L3-8</b>	17.18 ± 0.03	31.69 ± 0.04	12.85 ± 0.05
<b>L3-9</b>	17.12 ± 0.03	13.34 ± 0.03	10,75 ± 0.07
<b>L3-10</b>	24.65 ± 0.04	12.60 ± 0.10	14.55 ± 0.06
<b>L3-11</b>	58.39 ± 0.03	51.25 ± 0.04	39.95 ± 0.05
<b>L41</b>	> 100	> 100	54.09 ± 0.03
<b>L42</b>	> 100	> 100	> 100
<b>L43</b>	> 100	> 100	> 100
<b>L44</b>	> 100	> 100	> 100
<b>L45</b>	> 100	> 100	83.75 ± 0.02
<b>L46</b>	> 100	> 100	> 100
<b>L47</b>	> 100	> 100	89.60 ± 0.04
<b>L48</b>	> 100	> 100	73.07 ± 0.04

**L3-8**, **L3-9**, **L3-10** превышает активность исходного соединения либо сохраняется на том же уровне.

Следует отметить, что клетки линии HCT116 оказались наиболее чувствительными при воздействии на нее лактонами и их производными с IC<sub>50</sub> на уровне ~13 мкМ. При этом конъюгат эпоксиалантолактона с амином **8** сохранил активность на том же уровне, чего нельзя сказать об аналогичном производном амина **9**, которое только в случае лактона **L3** оказалось эффективным при подавлении роста клеток аденокарциномы кишечника.

### 5.2. Жизнеспособность опухолевых клеток линии K562 при воздействии исследуемыми соединениями

Жизнеспособность клеточной линии K562 при воздействии природными сесквитерпеновыми лактонами **L1**–**L6** и некоторыми аминокпроизводными была определена в тесте с водорастворимым прижизненным красителем ресазурином — натриевой солью 7-гидрокси-3*H*-феноксазин-3-он-10-оксида. Ресазурин, в отличие от МТТ, восстанавливается также цитохромами и дегидрогеназами цитоплазмы клетки [70]. Полученные данные по определению жизнеспособности клеток лейкоза позволяют предположить общую высокую токсичность как исходных сесквитерпеновых лактонов, так и модифицированных продуктов (табл. 8).

### 5.3. Определение интенсивности перекисного окисления липидов

Перекисное окисление липидов гомогената мозга крыс определяли по модифицированному ТБК-тесту [71]. В качестве инициатора генерации ПОЛ использовали источник ионов Fe<sup>3+</sup> — FeNH<sub>4</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> · 12 H<sub>2</sub>O. Восстановительную ак-

**Таблица 8.** Токсичность лактонов и их аминокпроизводных в отношении клеточной линии K562 (IC<sub>50</sub>, мкМ).

Соединение	IC <sub>50</sub>	Соединение	IC <sub>50</sub>
<b>L1</b>	6.27 ± 0.03	<b>L3-1</b>	7.57 ± 0.04
<b>L2</b>	9.64 ± 0.05	<b>L3-5</b>	6.45 ± 0.06
<b>L3</b>	3.95 ± 0.04	<b>L3-8</b>	7.36 ± 0.05
<b>L4</b>	4.73 ± 0.09	<b>L3-9</b>	7.03 ± 0.05
<b>L5</b>	6.83 ± 0.15	<b>L3-10</b>	5.81 ± 0.04
<b>L29</b>	5.38 ± 0.03		

тивность исследуемых соединений — эпоксиалантолактона (**L3**), его аддуктов Михаэля с триптамином (**L3-11**) и 4-метоксифенетиламином (**L3-16**), а также гидрированных бензо[*g*]-фуоро[4,3,2-*cd*]индолон **L40–L48** устанавливали на основании их активности в реакции переноса электрона с использованием CUPRAC-теста [72]. В качестве вещества-стандарта использовали 6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоциклическую кислоту (тролокс). В результате определения интенсивности перекисного окисления липидов гомогената мозга

**Таблица 9.** Антиоксидантная активность эпоксиалантолактона и его производных в тесте ингибирования ПОЛ (в % от контроля) и CUPRAC-тесте (в тролокс-эквивалентах).

Соединение	Ингибирование ПОЛ	CUPRAC-тест
<b>L3</b>	– *	– *
<b>L3-3</b>	77.69 ± 0.33	1.14 ± 0.12
<b>L3-11</b>	71.78 ± 3.81	0.65 ± 0.04
<b>L40</b>	73.57 ± 3.56	0.77 ± 0.07
<b>L41</b>	64.76 ± 8.28	0.23 ± 0.04
<b>L42</b>	72.95 ± 2.74	–
<b>L43</b>	73.42 ± 11.05	0.22 ± 0.06
<b>L44</b>	82.36 ± 1.29	–
<b>L3-16</b>	77.34 ± 6.09	–
<b>L45</b>	80.99 ± 3.69	0.30 ± 0.09
<b>L46</b>	76.28 ± 2.84	–
<b>L47</b>	79.99 ± 3.81	–
<b>L48</b>	87.39 ± 2.57	1.20 ± 0.06

**Примечание.** \* Прочерк означает, что влияния нет.

установлено, что исходный лактон, как и свободные амины, использованные для модификации (данные не приведены), не проявляют антиоксидантной активности в широком диапазоне концентраций. Отметим, что в ряде случаев природные лактоны проявляют прооксидантную активность [71], в то время как их модифицированные производные являются эффективными антиоксидантами (табл. 9, 10).

#### 5.4. Исследование влияния лактонов на клеточный цикл опухолевых клеток и формирование цитоскелета

Методами проточной цитометрии и флуоресцентной спектрофотометрии было исследовано влияние природных сесквитерпеновых лактонов и их производных на клеточный цикл опухолевых клеток и формирование цитоскелета клетки. Обнаружено, что в указанном эксперименте как природные сесквитерпеновые лактоны, так и их аминокислотные производные тормозят клеточный цикл клеток HeLa в G2/M-фазе и, соответственно, увеличивают процент накопления клеток в данной фазе, проявляя при этом разный уровень цитотоксичности. Такая активность может быть связана с нарушением формирования цитоскелета клетки и накоплением актина в пристеночном пространстве. Возможно, что именно этот механизм действия и лежит в основе цитотоксичности в отношении клеток HeLa (рис. 5–7, приведены оригинальные шифры соединений.)

**Таблица 10.** Антиоксидантная активность изоалантолактона, эпоксиизоалантолактона и их производных.

Соединение	% ингибирования ПОЛ 0.1 мМ вещества – индуктор — Fe <sup>3+</sup> (IC <sub>50</sub> , мкМ)	% ингибирования ПОЛ 0.1 мМ вещества (индуктор — т-БГП)	Fe <sup>2+</sup> -хелатирующая активность (%) 0.1 мМ вещества (EC <sub>50</sub> , мкМ)	Антирадикальная активность (%) 0.1 мМ вещества
<b>L2</b>	Прооксидантная активность	Нет активности	Нет активности	Нет активности
<b>L4</b>	Прооксидантная активность	Нет активности	Нет активности	Нет активности
<b>L2-11</b>	65.7 ± 16.3% (31.2 ± 11.1)	Нет активности	85.5 ± 4.3% (30.6 ± 3.2)	Нет активности
<b>L4-11</b>	65.5 ± 3.42% (31.9 ± 10.1)	Нет активности	59.8 ± 4.3% (83.02 ± 4.3)	Нет активности
<b>L2-19</b>	65.4 ± 5.4% (13.9 ± 1.1)	Нет активности	81.5 ± 2.6% (40.2 ± 2.9)	Нет активности
<b>L2-16</b>	17.07 ± 5%	Нет активности	38.4 ± 3.1% (> 100)	Нет активности
<b>L4-16</b>	23.8 ± 4.74%	13.35 ± 2.22%	59.9 ± 1.9% (74.6 ± 4.8)	Нет активности
<b>L4-20</b>	47.5 ± 1.75%	10.00 ± 0.48%	Нет активности	< 10%
<b>L2-20</b>	35.14 ± > 4.93%	13.35 ± 1.86%	Нет активности	Нет активности
<b>L2-21</b>	33.1 ± 27.37%	Нет активности	53.7 ± 3.9% (86.8 ± 1.9)	< 10%
<b>L4-21</b>	11,17 ± 2.01%	Нет активности	35.6 ± 2.8%	Нет активности
<b>L2-22</b>	34.9 ± 8.9%	12.39 ± 4.16%	Нет активности	68,9 ± 2,1%
<b>L2-23</b>	Прооксидантная активность	Прооксидантная активность	62.3 ± 15% (45 ± 14.6)	Нет активности

**Примечание.** Амин **20** — алкалоид анабазин, **21** — фенетиламин, **22** — алкалоид сальсолидин, **23** — псевдоэфедрин.

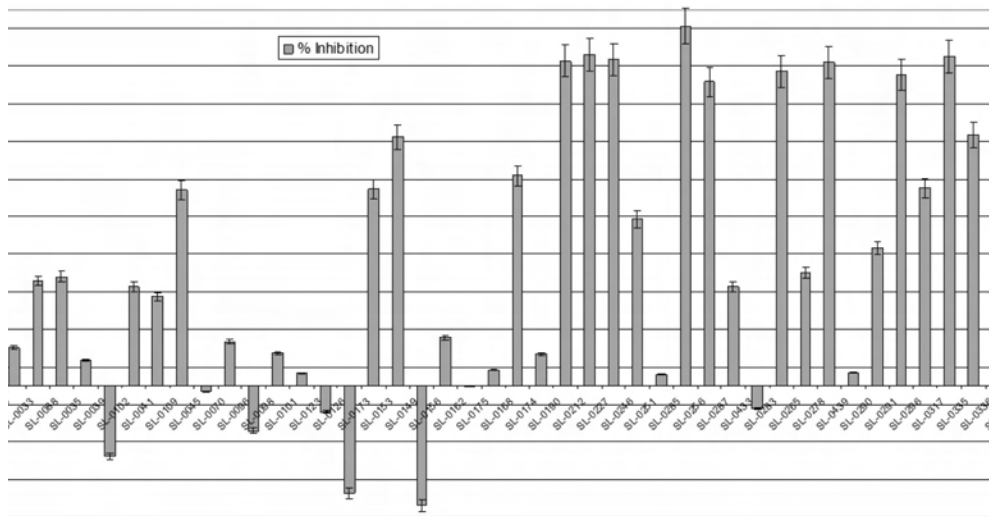


Рис. 5. Влияние сесквитерпеновых лактонов и их производных на клеточный цикл линии HeLa — ингибирование роста.

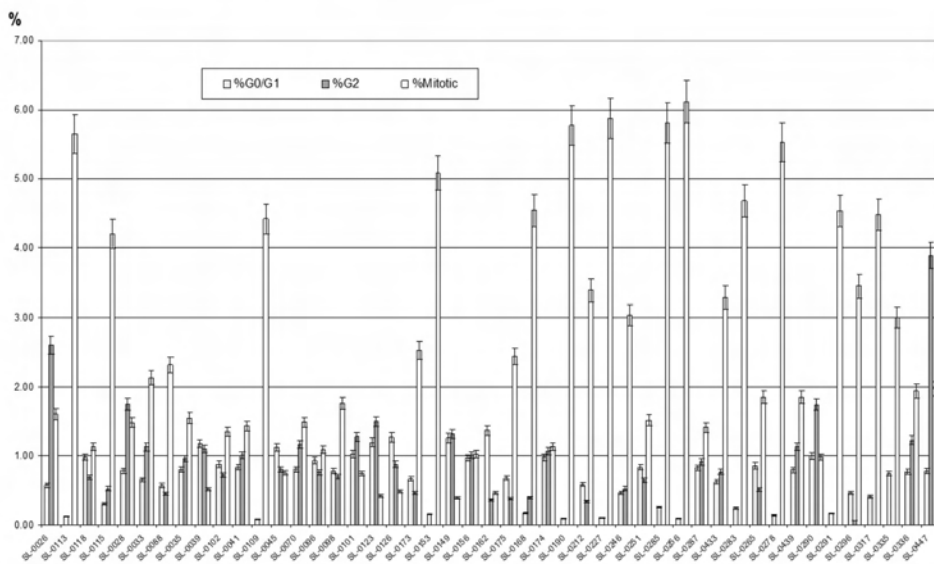


Рис. 6. Влияние сесквитерпеновых лактонов и их производных на клеточный цикл линии HeLa.

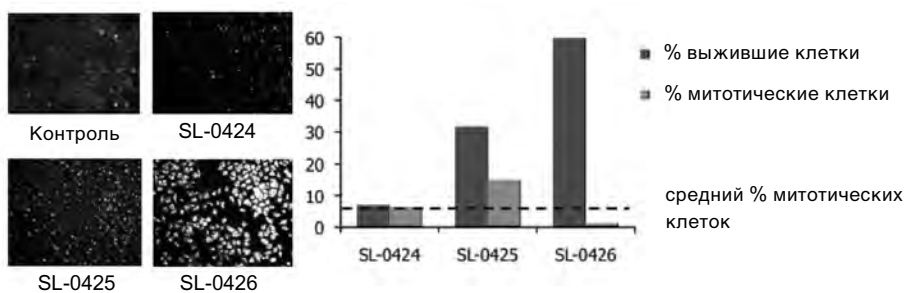


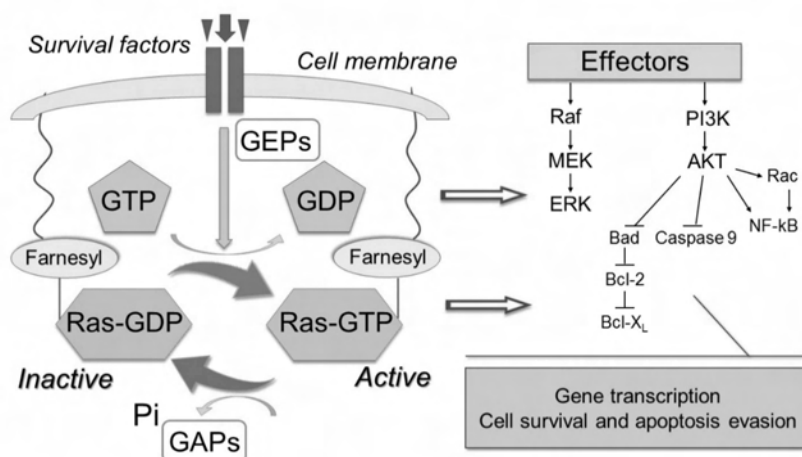
Рис. 7. Влияние соединений на клеточный цикл в G2/M фазе и формирование актина цитоскелета клеток. Клетки HeLa обработанные исследованными соединениями, окраска на актин Alexa-фаллоидином (SL-0424, SL-0425 и L-0426 — конъюгаты даунорубицина с лактонами L02, L04 и L01 соответственно).

Особенно этот эффект проявляется в случае конъюгатов антрациклинового антибиотика даунорубицина с алантолактоном, изоалантолактоном и его эпоксипроизводным. Как видно из приведенных на рис. 5–7 данных, природные сесквитерпеновые лактоны и их конъюгаты с различными аминами проявляют антипролиферативное действие на уровне  $10^{-8}$  М. Кроме того, эти соединения не только останавливают клеточный цикл в G2/M фазе, но и влияют на формирование актина цитоскелета клеток.

### 5.5. Антифарнезилтрансферазная активность сесквитерпеновых лактонов и их производных

В патогенезе неопластов важным моментом является процесс передачи экстраклеточного стимула с рецепторов на поверхности клетки и передачи сигналов внутрь и внутри клетки. Одни из наиболее многообещающих и изучаемых сигнальных путей — сигнальные пути Ras/MAPK (митогенактивируемая протеинкиназа) и фосфоинозитол-3-киназы (PI-3K) [4, 73]. Изменения в этих сигнальных каскадах ведут к изменению многих клеточных функций — роста клетки, пролиферации, дифференциации, адгезии, выживании клетки.

Все эти сигнальные каскады тесно связаны с Ras-белками. Для развития онкогенной активности белков Ras необходимо их фарнезилирование. Ингибиторы фарнезилтрансферазы (ФТИ) не только способны вернуть Ras-трансформированные клетки к нормальному фенотипу, но и вызывают регрессию опухоли. В последние годы выяснилось, что противоопухолевый эффект ФТИ гораздо шире, чем просто Ras-ингибирование и связан не только с Ras-онкогеном, но и с ингибированием сигнальных путей Ras/MAPK и PI-3K и с изменением чувствительности раковых клеток к проапоптотическим факторам в результате активации митохондриальных



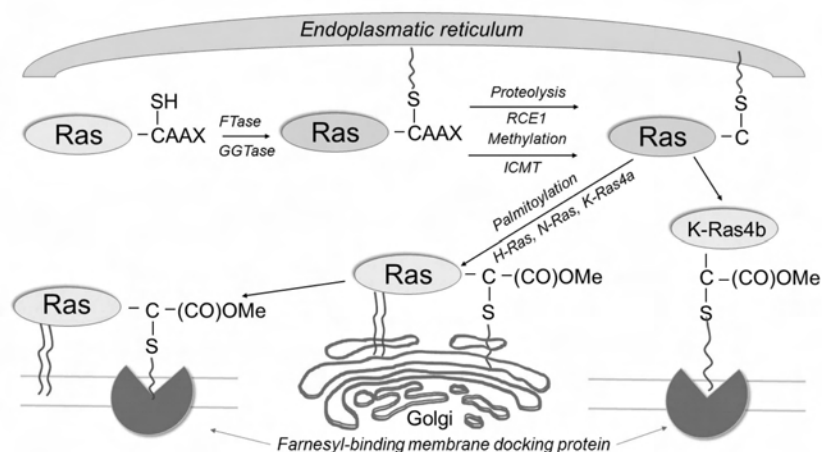
**Рис. 8.** Онкогены Ras представлены четырьмя классами белков: HRas, KRas4a, KRas4b, и NRas и являются ГТПазами. Когда Ras связан с GTP — он активен, форма белка, связанная с GDP, — не активна. Ras-GTP связывается с большим количеством разнообразных эффекторных белков, которые по каскадам сигнальных путей передают стимул внутрь клетки. Эти сигнальные пути определяют процессы пролиферации, дифференциации клетки и ее способность избежать апоптоза.

механизмов апоптоза и инактивации ряда онкогенов [4] (рис. 8).

Для того чтобы Ras-белки стали активными и участвовали в каскаде передачи экстраклеточного сигнала ростовых факторов и цитокинов необходимо их встраивание в мембрану клетки. Синтезируются белки семейства Ras в виде неактивного цитозольного пропептида — p21. Все три основных белка семейства Ras H-, N-, и K-Ras проходят серию посттрансляционных модификаций, которые можно разделить на два этапа [4] (рис. 9). Ras-GTP связывается с большим количеством разнообразных эффекторных белков, которые по каскадам сигнальных путей передают стимул внутрь клетки. Эти сигнальные пути определяют процессы пролиферации, дифференциации клетки и ее способность избежать апоптоза.

Поскольку ингибиторы фарнезилтрансферазы затрагивают только клетки с выраженной экспрессией онкогена Ras, нормальные клетки не подвержены их воздействию и остаются неповрежденными. Следовательно, разрабатываемые антинеопласты на основе ингибиторов фарнезилтрансферазы будут проявлять антипролиферативное и проапоптотическое действие селективное только для раковых клеток.

Определение фарнезилтрансферазной активности соединений проводили по модифицированному методу [74]. Результаты исследования



**Рис. 9.** Концевой участок Ras белка CAAX алкилируется фарнезилтрансферазой или геранилгеранилтрансферазой. CAAX аминокислотный концевой участок отщепляется в эндоплазматическом ретикулуме RCE1 и метилируется ICMT. В комплексе Golgi, HRas, NRas, и KRas4a пальмитоилируются. KRas4b встраивается в мембрану посредством фарнезильного остатка. HRas, NRas, и KRas4a встраиваются в мембрану за счет пальмитоильного и фарнезильного остатка.

способности некоторых полусинтетических производных сесквитерпеновых лактонов ингибировать фарнезилтрансферазу представлены в табл. 11 [25].

Удельная активность ряда исследованных соединений — на уровне известных ингибиторов фарнезилтрансферазы:  $IC_{50}$  в диапазоне 0.3–5 мМ. Важной особенностью этих соединений является их активность не только в отношении фарнезилтрансферазы, но и в отношении других ключевых ферментов Ras/MAPK-PI-3K каскада регуляции апоптоза (например, АКТ и PI3K) [25]. Можно предположить, что данные соединения реализуют свою активность не только через ингибирование пост-трансляционного процессинга онкогена Ras, но и задействуют многие

**Таблица 11.** Активность соединений в отношении фарнезилтрансферазы.

Соединение	Активность ФТазы ( $IC_{50}$ )
KSLD-LO-A-05	$0.36 \pm 0.12 \mu\text{M}$
KSLD-LO-071	$8.1 \pm 1.1 \mu\text{M}$
KSLD-AN-07	$0.30 \pm 0.07 \mu\text{M}$
KSLD-LO-A-34	$10.7 \pm 1.2 \mu\text{M}$
KSLD-LO-A-27	$1.3 \pm 0.12 \mu\text{M}$
KSLD-012	$5.0 \pm 1.0 \mu\text{M}$
KSLD-078	$10.4 \pm 2.3 \mu\text{M}$
Андростатин	$13.3 \pm 2.3 \mu\text{M}$
Хетомелиевая кислота	$2.6 \pm 0.65 \text{mM}$

другие мишени этого сигнального каскада, в частности фарнезилирование RhoB [75, 76].

### 5.6. Исследование гибели опухолевых клеток по типу апоптоза с помощью проточной цитометрии

Апоптоз, аутофагия и некроз являются основными типами гибели клетки. Апоптоз представляет собой запрограммированный, физиологический «режим» гибели, который играет важную роль в гомеостазе тканей. Нарушение регуляции этого процесса приводит к патологическим состояниям, таким как болезнь

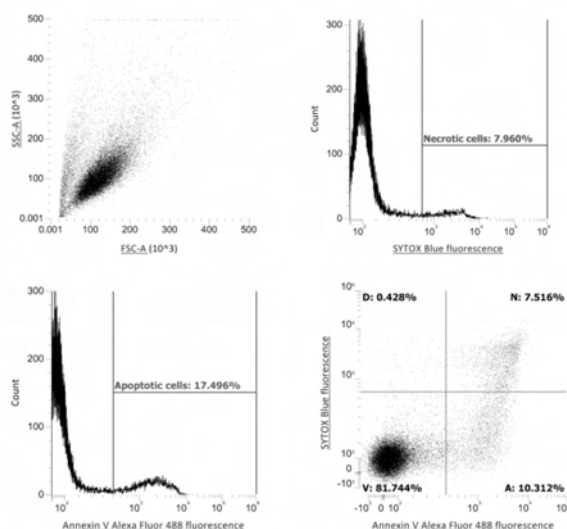
Альцгеймера и развитию различных новообразований. Установление основных механизмов, лежащих в основе апоптоза, позволит определить мишени воздействия, которые выявят дисбаланс между неконтролируемой клеточной пролиферацией и ее гибелью.

Апоптоз отличается характерными морфологическими и биохимическими изменениями клетки, в том числе уплотнением и фрагментацией хроматина, «усадкой» цитоплазмы и потерей мембраной асимметрии. Последняя особенность может быть вызвана транслокацией фосфатидилсерина на внешней поверхности цитоплазматической мембраны апоптотической клетки.

Исследование действия эпоксиантолактона **L3** и ряда его модифицированных производных в отношении клеток миелоидного лейкоза на предмет апоптоза основано на детектировании флуоресцентного сигнала от  $Ca^{2+}$ -зависимого фосфолипид-связывающего белка (Ex/Em: 488/499), имеющего высокое сродство к фосфатидилсерину (аннексин V) (рис. 10).

Используемый в качестве стандарта камптотецин (алкалоид хинолинового ряда) вызывает увеличение апоптотической популяции клеток K562 в 4 раза по сравнению с уровнем контроля, а эпоксиантолактон **L5** при таких же условиях (см. рис. 10) в 2 раза.





**Рис. 10.** Цитограммы и гистограммы клеток K562 при воздействии эпокси-алантолактоном **L3** (5 мкМ) после 24 ч инкубации.

Все протестированные соединения показывают приблизительно одинаковый уровень активности. Отметим, что воздействие таких соединений на популяцию клеток K562 стабильно приводит к появлению около 10% апоптотических клеток, что в два раза превышает количество апоптотических клеток в контроле. Следовательно, действия сесквитерпеновых лактонов на клетку осуществляется в основном за счет включения механизмов индукции апоптоза.

### 5.7. Исследование участия сигнального пути p53 в гибели опухолевых клеток

Известно, что эффективность большинства современных противоопухолевых препаратов связана с их способностью индуцировать гибель опухолевых клеток по пути апоптоза. Установлено также, что в биохимической активации программы апоптоза в клетке участвуют сигнальные пути белка p53: действуя на митохондриальный путь апоптоза, p53 репрессирует транскрипцию антиапоптотического белка Bcl2 и активирует транскрипцию про-апоптотических белков Bax [77–78]. В опухолях человека наблюдается высокая частота мутаций, затрагивающих белок p53, и благодаря этому сигнальные пути апоптоза, в которых участвует мутантный p53, приобретают устойчивость как к регуляции эндогенными факторами, так и к способности противоопухолевых препаратов их активировать. В связи с этим актуальным является поиск соединений, которые

способны индуцировать в опухолевых клетках апоптоз в обход сигнальных путей белка p53.

Для определения участия эндогенного белка p53 в формировании цитотоксической активности исследуемых сесквитерпеновых лактонов и их производных использовали клеточную линию аденокарциномы толстого кишечника человека НСТ116 wt p53, экспрессирующую белок p53, и ее вариант с нокаутом этого белка (НСТ116 p53–/–). Результаты определения цитотоксичности соединений в отношении данных линий клеток представлены в табл. 12.

Токсичность исходного эпоксиалантолактона для линии клеток аденокарциномы толстого кишечника человека НСТ116 wt p53 (экспрессирующая белок p53) превышает токсичность для линии с нокаутом этого белка почти в 2 раза, что может свидетельствовать о вкладе сигнального пути p53 в цитотоксичность лактона данного лактона. При этом только одно производное эпоксиалантолактона (**L3-3**) показало отсутствие токсичности в отношении нокаутированной линии клеток и, наоборот, умеренную токсичность в отношении «дикого» типа. На основании проведенного эксперимента можно сделать вывод, что сигнальный путь p53 в механизме цитотоксичности как **L3-3**, так и **L3-16** является одним из основополагающих, а соответственно, остальные соединения индуцируют гибель клеток в обход сигнальных путей белка p53. Отдельно необходимо отметить соединение **L3-9**, действие которого превышает эффектив-

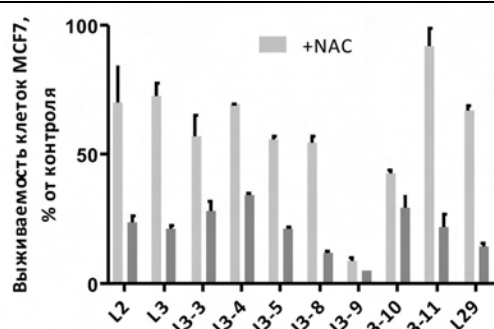
**Таблица 12.** Токсичность ряда исследуемых соединений в отношении опухолевых клеточных линий НСТ116 и НСТ116 p53 (IC<sub>50</sub>, мкМ).

Шифр	Клеточная линия	
	НСТ116 wt p53	НСТ116 p53–/–
<b>L1</b>	12.92 ± 0.04	23.89 ± 0.04
<b>L2</b>	38.09 ± 0.03	37.60 ± 0.07
<b>L4</b>	52.27 ± 0.03	61.31 ± 0.09
<b>L3</b>	13.88 ± 0.04	21.64 ± 0.05
<b>L3-3</b>	24.40 ± 0.05	> 100
<b>L3-5</b>	22.48 ± 0.07	29.05 ± 0.04
<b>L3-9</b>	10.75 ± 0.07	10.07 ± 0.03
<b>L3-10</b>	14.55 ± 0.06	18.05 ± 0.08
<b>L3-11</b>	39.95 ± 0.05	36.71 ± 0.04
<b>L41</b>	54.09 ± 0.03	47.29 ± 0.02
<b>L3-16</b>	68.35 ± 0.02	72.83 ± 0.03
<b>L29</b>	31.61 ± 0.06	51.29 ± 0.09
<b>L5</b>	48.53 ± 0.08	> 100

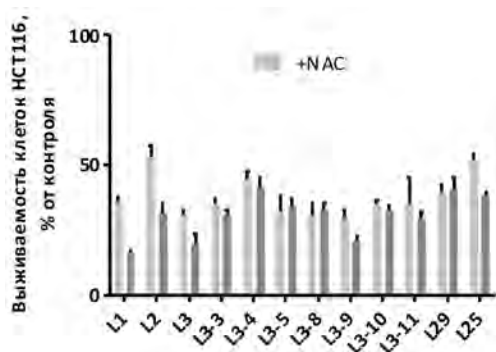
ность исходного лактона. Кроме того, для этого соединения характерно также наличие одинаковой цитотоксичности как в отношении клеток «дикого» типа, так и нокаутных клеток, в отличие от исходного лактона. Это является наиболее интересным, так как позволяет выйти к соединениям, действующим в обход сигнальных путей белка p53.

### 5.8. Предобработка *N*-ацетилцистеином

Известный ингибитор образования АФК — *N*-ацетилцистеин — был использован для выяснения роли вклада окислительного стресса, вызываемого действием соединений, в механизм гибели опухолевых клеток. Предварительная обработка *N*-ацетилцистеином снижает токсический эффект исследуемых соединений в разной степени (рис. 11) вплоть до практически полного подавления цитотоксического эффекта соедине-



**Рис. 11.** Выживаемость клеток MCF7 при действии исследуемыми соединениями (100 мкМ) в присутствии *N*-ацетилцистеина (NAC) и без него по результатам МТТ-теста (48 ч экспозиции,  $n = 3$ , планки погрешностей означают  $\pm$ SD от значения).



**Рис. 12.** Выживаемость клеток HCT116 при действии исследуемыми соединениями (100 мкМ) в присутствии *N*-ацетилцистеина (NAC) и без него по результатам МТТ-теста (48 ч экспозиции,  $n = 3$ , планки погрешностей означают  $\pm$ SD от значения).

ния **L3-9**. В случае изоалантолактона [79] было показано, что предварительная обработка различных опухолевых клеточных линий *N*-ацетилцистеином полностью сохраняет жизнеспособность клеток, указывая, что цитотоксическое действие на клетки осуществляется в основном через генерацию АФК.

В эксперименте с клетками MCF7 сохраняют свою токсичность только соединения **L3-10** и **L3-11**.

Аналогичные результаты наблюдались и в случае с оценкой токсичности веществ в отношении клеток MS.

В эксперименте с клетками аденокарциномы HCT116 в присутствии *N*-ацетилцистеина только лактоны **L1**, **L2** и **L5** показали снижение эффективности действия, а все остальные соединения сохранили свою токсичность на том же уровне (рис. 12).

Таким образом, можно предположить, что в основе цитотоксической активности производных эпоксиалантолактона лежат механизмы, связанные не только с продукцией свободных радикалов и влиянием на окислительное повреждение липидов. В большинстве случаев антиоксидантный потенциал этих соединений не препятствует проявлению цитотоксичности по отношению к клеточной линии HCT116. Участие АФК-зависимых механизмов в гибели клеток более выражено для линий MCF7 и MS, для которых цитотоксический эффект исследованных соединений в большей степени может быть предотвращен присутствием АФК-акцептора. Для клеток линии HCT116 такой закономерности не наблюдается.

### 5.9. Исследование антипролиферативной активности конъюгатов сесквитерпеновых лактонов и антрациклиновых антибиотиков

Антипролиферативную активность полученных конъюгатов сесквитерпеновых лактонов и антрациклиновых антибиотиков, а также самих лактонов изучали *in vitro* с помощью МТТ-теста на культурах опухолевых клеток человека A549 (карцинома легкого), HCT116 (карцинома кишечника), MCF7 (аденокарцинома молочной железы), RD (рабдомиосаркома) [62, 63, 67].

Результаты эксперимента по изучению цитотоксичности, представленные в табл. 13, демонстрируют, что сила действия антрациклиновых

**Таблица 13.** Цитотоксичность *in vitro* конъюгатов даунорубицина и доксорубицина с сесквитерпеновыми лактонами.

Соединение	IC <sub>50</sub> , μM				
	A549	HCT116	MCF7	RD	HEK293
<b>L1</b>	32.04 ± 3.24	11.31 ± 0.27	17.51 ± 0.60	10.37 ± 0.79	74.03 ± 0.51
<b>L2</b>	36.73 ± 1.43	10.57 ± 0.04	13.15 ± 0.93	5.48 ± 0.20	36.47 ± 0.07
<b>L6</b>	23.12 ± 1.18	34.52 ± 3.51	17.92 ± 0.68	8.82 ± 0.14	35.87 ± 0.48
<b>L4</b>	83.51 ± 0.26	21.40 ± 0.32	31.87 ± 0.14	18.60 ± 0.21	105.68 ± 4.13
<b>L3</b>	21.49 ± 0.75	5.12 ± 0.05	11.41 ± 0.32	4.81 ± 0.12	38.10 ± 1.08
<b>L29</b>	50.28 ± 1.11	9.75 ± 0.57	24.03 ± 0.80	8.77 ± 0.01	18.47 ± 0.20
<b>L5</b>	61.71 ± 2.40	10.80 ± 0.18	38.55 ± 0.86	16.78 ± 0.28	29.77 ± 0.05
<b>L30</b>	59.86 ± 2.26	4.99 ± 0.06	4.31 ± 0.02	4.94 ± 0.09	9.07 ± 0.25
<b>DNR</b>	0.33 ± 0.01	0.12 ± 0.00	0.84 ± 0.17	0.63 ± 0.03	12.31 ± 1.17
<b>L1-DNR</b>	0.93 ± 0.06	0.28 ± 0.00	3.95 ± 0.03	0.96 ± 0.02	3.43 ± 0.04
<b>L2-DNR</b>	0.66 ± 0.04	0.09 ± 0.00	3.07 ± 0.02	0.71 ± 0.01	6.23 ± 0.38
<b>L6-DNR</b>	1.42 ± 0.05	1.01 ± 0.01	1.24 ± 0.23	0.59 ± 0.05	6.37 ± 0.24
<b>L4-DNR</b>	0.27 ± 0.01	0.02 ± 0.00	1.99 ± 0.27	0.63 ± 0.02	11.41 ± 0.53
<b>L3-DNR</b>	1.19 ± 0.02	1.30 ± 0.02	1.84 ± 0.06	0.80 ± 0.00	18.19 ± 0.18
<b>L29-DNR</b>	0.56 ± 0.01	0.26 ± 0.01	1.47 ± 0.04	0.41 ± 0.02	3.68 ± 0.16
<b>L5-DNR</b>	2.01 ± 0.09	0.20 ± 0.01	1.90 ± 0.07	1.95 ± 0.01	6.42 ± 0.21
<b>L30-DNR</b>	1.05 ± 0.00	0.12 ± 0.00	0.73 ± 0.06	0.27 ± 0.02	6.15 ± 0.14
<b>DOX</b>	0.38 ± 0.02	0.14 ± 0.01	0.46 ± 0.03	0.29 ± 0.02	6.78 ± 0.76
<b>L1-DOX</b>	2.21 ± 0.06	2.81 ± 0.05	11.11 ± 0.17	2.41 ± 0.03	19.82 ± 0.42
<b>L2-DOX</b>	3.29 ± 0.11	4.55 ± 0.03	26.76 ± 0.65	2.67 ± 0.11	29.83 ± 0.18
<b>L6-DOX</b>	3.18 ± 0.09	1.26 ± 0.05	8.41 ± 0.02	2.98 ± 0.06	11.00 ± 0.11
<b>L4-DOX</b>	1.86 ± 0.12	1.07 ± 0.01	5.65 ± 0.22	2.76 ± 0.02	11.73 ± 0.10
<b>L3-DOX</b>	4.52 ± 0.57	2.52 ± 0.02	3.03 ± 0.07	2.47 ± 0.07	4.50 ± 0.32
<b>L29-DOX</b>	0.88 ± 0.11	0.25 ± 0.04	2.94 ± 0.02	1.18 ± 0.01	0.98 ± 0.23
<b>L5-DOX</b>	5.43 ± 0.16	0.92 ± 0.00	6.03 ± 0.11	4.22 ± 0.10	10.49 ± 0.88
<b>L30-DOX</b>	1.87 ± 0.07	0.43 ± 0.02	2.34 ± 0.01	1.03 ± 0.02	16.42 ± 1.07

антибиотиков даунорубицина (DNR) и доксорубицина (DOX) по отношению к исследованным культурам опухолевых клеток примерно одинакова, конъюгаты сесквитерпеновых лактонов с даунорубицином активнее соответствующих конъюгатов с доксорубицином. Это различие последовательно выполняется по отношению ко всем используемым в эксперименте клеточным линиям.

Эпоксизоалантолактон **L4** проявил наименьшие цитотоксические свойства среди сесквитерпеновых лактонов на культуре клеток A549, тогда как его производное с даунорубицином **L4-DNR** показало цитотоксичность выше, чем у даунорубицина. Остальные производные по отношению к линии клеток A549 менее токсичны, чем антрациклиновые антибиотики.

Культура клеток HCT116 оказалась наиболее чувствительна к действию доксорубицина и даунорубицина, по отношению к ней конъюгат эпоксизоалантолактона с даунорубицином **L4-DNR** проявил в 6 раз большую цитотоксичность, чем исходный даунорубицин. Вторым активным

соединением, IC<sub>50</sub> которого сравним с IC<sub>50</sub> даунорубицина, стал конъюгат даунорубицина с алантолактоном **L1-DNR**. Эпоксизоалантолактон **L3**, который сам по себе проявил более выраженные цитотоксические свойства на всех выбранных культурах клеток, при присоединении антрациклиновых антибиотиков, не показал значимой активности.

По отношению к культуре опухолевых клеток RD практически все конъюгаты даунорубицина продемонстрировали активность, сравнимую с даунорубицином, а конъюгат с эпоксизоалантолактоном **L29** даже бо́льшую. Данная культура оказалась самой чувствительной к действию конъюгатов с даунорубицином, а

также исходных лактонов.

Представленные в табл. 13 данные показывают, что по отношению к культуре клеток MCF7 все конъюгаты лактонов с антрациклиновыми антибиотиками были менее активны, чем даунорубицин и доксорубицин. В целом эта культура отличается меньшей восприимчивостью к действию цитостатиков, что видно по результатам препаратов сравнения, однако для конъюгатов разница между цитотоксичностью к MCF7 и к любой другой выбранной культуре, была еще больше.

Для оценки селективности конъюгатов к опухолевым клеткам в качестве нормальной линии клеток человека была выбрана псевдонормальная линия клеток эмбрионального почечного эпителия человека HEK293. Полученные результаты демонстрируют, что сами антрациклиновые антибиотики менее токсичны для клеток линии HEK293. IC<sub>50</sub> даунорубицина по отношению к HEK293 в 100 раз выше, чем его IC<sub>50</sub> по отношению к HCT116, для доксорубицина — в 50 раз. Эта селективность меньше выражена у

сесквитерпеновых лактонов, но хорошо прослеживается у конъюгатов даунорубицина.

Значение  $IC_{50}$  изоалантолактона **L2** по отношению к НЕК293 в 7 раз выше, чем его  $IC_{50}$  по отношению к НСТ116,  $IC_{50}$  алантолактона **L1** — в 7 раз выше, чем его  $IC_{50}$  по отношению к RD. Однако,  $IC_{50}$  конъюгата алантолактона с даунорубицином **L1-DNR** по отношению к НЕК293 в 70 раз выше, чем его  $IC_{50}$  по отношению к культуре клеток НТ116.  $IC_{50}$  конъюгата эпоксиизоалантолактона с даунорубицином **L4-DNR** — в 570 раз выше, чем его  $IC_{50}$  по отношению к НСТ116 и в 42 раза по отношению к А549.

Таким образом, среди синтезированных соединений наиболее интересен конъюгат даунорубицина с эпоксиизоалантолактоном **L4-DNR**, так как он обладает на ряде культур лучшими антипролиферативными свойствами, чем даунорубицин, без увеличения токсичности по отношению к нормальным клеткам.

#### 5.10. Исследование влияния конъюгатов сесквитерпеновых лактонов с антрациклиновыми антибиотиками на опухолевые клетки, резистентные к даунорубицину

Важной проблемой при применении противоопухолевых агентов, в том числе и антрациклиновых антибиотиков, является снижение их активности вследствие развития резистентности опухолевых клеток. В связи с этим было проведено исследование цитотоксичности самого перспективного конъюгата **L4-DNR** в отношении резистентной к даунорубицину линии клеток. Развитие резистентности связывают со взаимодействием между препаратами и транспортными белками (Р-гликопротеин и белок множественной лекарственной резистентности). В случае с даунорубицином и доксорубицином Р-гликопро-

теин присоединяется через атом N-3' дауноз-амина. Самый активный из синтезированных конъюгатов **L4-DNR** также закрывает для Р-гликопротеина область прикрепления к даунорубицину, так как присоединен через N-3'-связь, что дает возможность предполагать модификацию взаимодействия такого препарата с резистентными опухолевыми клетками.

В нашей лаборатории из линии клеток K562 путем продолжительного культивирования под воздействием все увеличивающихся доз даунорубицина была получена резистентная к даунорубицину линия клеток K562/DNR. Обе линии — родительскую K562 и резистентную K562/DNR параллельно подвергли воздействию **DNR** и **L4-DNR** в диапазоне доз от 100 до 0.1 мкМ в течение 24, 48 и 72 часов, после чего определяли цитотоксичность в тесте с Alamar blue с вычислением  $IC_{50}$ . Результаты представлены в табл. 14.

Согласно данным, приведенным в табл. 14, цитотоксичность соединений по отношению к линии K562 в течение 3 сут развивается по нарастающей. Если через одни сутки 50%-ная ингибирующая концентрация даунорубицина в 3 раза больше, чем **L4-DNR**, то к 72 часам инкубации даунорубицин становится токсичнее **L4-DNR**. Совершенно иная картина открывается при исследовании цитотоксичности в отношении резистентной линии клеток K562/DNR. Даунорубицин становится менее токсичным на всем протяжении опыта: его  $IC_{50}$  приблизительно в 3, 100 и 200 раз выше, чем в отношении родительской K562 через 24, 48 и 72 часа воздействия соответственно. Конъюгат **L4-DNR** демонстрирует меньшее снижение цитотоксичности — в 3, 5 и 25 раз через 24, 48 и 72 часа соответственно, на всем протяжении опыта оставаясь достоверно более активным соединением, чем даунорубицин.

Таким образом, нами показано, что конъюгаты даунорубицина с сесквитерпеновыми лактонами — алантолактоном (**L1**), изоалантолактоном (**L2**), аллоалантолактоном (**L6**) и их эпоксипроизводными **L3**, **L4**, **L29** — обладают большей активностью по отношению к опухолевым линиям клеток человека, чем соответствующие конъюгаты доксорубицина. Соединением-лидером является конъюгат дау-

**Таблица 14.** Сравнение цитотоксичности **DNR** и **L4-DNR** по отношению к резистентной к даунорубицину (K562/DNR) и родительской линии клеток (K562) в тесте с резазурином.

Культура	Соединение	$IC_{50}$		
		24 часа	48 часов	72 часа
K562	DNR	23.48 ± 0.02	0.74 ± 0.03	0.42 ± 0.04
	4-DNR	7.83 ± 0.25*	2.48 ± 0.07*	0.69 ± 0.00*
K562/DNR	DNR	64.82 ± 0.68	68.26 ± 0.37	80.73 ± 0.89
	4-DNR	20.26 ± 0.19*	12.19 ± 0.18*	17.84 ± 0.74*

**Примечание.\***  $p \leq 0.05$  по отношению к клеткам, подвергнутым воздействию DNR.

норубицина с эпоксиизоалантолактоном **L4-DNR**, который помимо высокой цитотоксичности на ряде линий, в том числе устойчивой к даунорубицину, демонстрирует большую цитотоксичность, чем даунорубицин, не проявляя повышенной токсичности по отношению к нормальным клеткам человека.

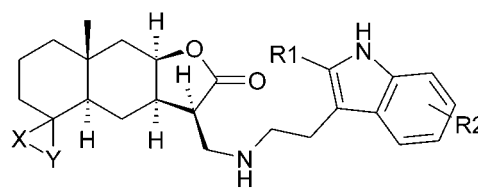
### 5.11. Активность конъюгатов сесквитерпеновых лактонов с триптамими

Интересные результаты получены при изучении биологической активности конъюгатов лактонов **L2**, **L4** с незамещенным (**11**) и замещенными (**19**, **24–31**) триптамими (3-(2-аминоэтил)индолами) [80, 81]. Последние относятся к классу физиологически активных индольных алкалоидов и зарекомендовали себя как эффективные нейромодуляторы [82].

Реакция изоалантолактона и его эпоксипроизводного с триптамими протекала довольно легко, ее продолжительность практически не зависела от природы заместителей в бензольном кольце (Me, Bu<sup>n</sup>, Bu<sup>s</sup>, Cl, CF<sub>3</sub>) исходного амина. Для выделения и очистки полученных продуктов использовали препаративную ВЭЖХ.

Было изучено влияние триптаминовых производных на процесс пероксидного окисления липидов (ПОЛ) гомогената мозга крыс, инициированного ионом Fe<sup>3+</sup> или *трет*-бутилгидропероксидом (тБГП) (табл. 15).

Как уже было отмечено выше, исходные ненасыщенные  $\gamma$ -лактоны — изоалантолактон (**L2**) и его эпоксицированное производное **L4** — не проявляют антиоксидантной активности; более того, они усиливают интенсивность Fe<sup>3+</sup>-индуцированного ПОЛ, т.е. являются прооксидантами. Триптамин (**11**) не показал антиоксидантной активности в условиях эксперимента (см. табл. 15). Ранее было установлено [83], что триптамин он активен только в миллимолярных концентрациях (IC<sub>50</sub> = 0.84 ммоль · л<sup>-1</sup>). Тем более неожиданным



**L2-11, L2-19, L2-24–L2-31; L4-11, L4-19**

X–Y = CH<sub>2</sub> (**L2**), OCH<sub>2</sub> (**L4**); R<sup>1</sup> = H: R<sup>2</sup> = H (**11**), 5-MeO (**19**), Bu<sup>n</sup> (**24**); R<sup>1</sup> = Me: R<sup>2</sup> = 5-BnO (**25**), 5-MeO (**26**), 7-CF<sub>3</sub> (**27**), H (**28**), 5-Bu<sup>s</sup> (**29**), 5-Cl (**30**), 5,7-Me<sub>2</sub> (**31**)

является тот факт, что полученные триптаминовые аддукты эффективно подавляют Fe<sup>3+</sup>-индуцированное ПОЛ (см. табл. 1), причем активность конъюгатов изоалантолактона **L1** с триптамими **24**, **26**, **28**, **29**, **30** сравнима с таковой для известного антиоксиданта ионола.

Все аддукты являются хелатирующими агентами для иона железа, хотя прямой корреляции между антиоксидантной активностью и способностью связывать ионы Fe<sup>2+</sup> не наблюдается. По отношению к тБГП-индуцированному ПОЛ триптаминовые производные лактонов значительно менее активны. Антиоксидантное действие выявлено только для аддуктов изоалантолактона **L1** с триптамими **11**, **24**, **26**, **28**, **29**, **30** в концентрации 100 мкмоль · л<sup>-1</sup>, данные соединения показали также антирадикальную активность в тесте с модельным стабильным радикалом — дифенилпикрилгидразилом (ДФПГ).

Исследование влияния полученных триптаминовых аддуктов на функциональные характеристики митохондрий показало, что и эпоксиизо-

**Таблица 15.** Влияние триптаминовых производных лактонов на процесс пероксидного окисления липидов гомогената мозга крыс, инициированного ионом Fe<sup>3+</sup> и *трет*-бутилгидропероксидом, Fe<sup>2+</sup>-хелатирующая и антирадикальная активность соединений.

Соединение	Ингибирование ПОЛ		Fe <sup>2+</sup> -хелатирующая активность, <sup>a</sup> %	Антирадикальная активность (ДФПГ-тест), <sup>a</sup> %
	индуктор Fe <sup>3+</sup> , IC <sub>50</sub> , мкмоль · л <sup>-1</sup>	индуктор тБГП, <sup>a</sup> %		
<b>L2-11</b>	31.2 ± 11.0	Нет	85.5 ± 4.3 (30.6 ± 3.2) <sup>b</sup>	Нет
<b>L2-19</b>	13.9 ± 1.1	Нет	81.5 ± 2.6 (40.2 ± 2.9) <sup>b</sup>	Нет
<b>L2-24</b>	4.2 ± 2.4	39.8 ± 4.7	25.4 ± 5.1	35.3 ± 0.9
<b>L2-26</b>	3.9 ± 0.4	32.5 ± 3.1	34.7 ± 0.7	28.2 ± 0.7
<b>L2-28</b>	5.0 ± 1.0	22.4 ± 5.4	42.7 ± 3.1	14.7 ± 2.9
<b>L2-29</b>	4.3 ± 0.4	46.9 ± 6.4	32.4 ± 2.5	19.4 ± 0.4
<b>L2-30</b>	7.7 ± 0.6	31.4 ± 2.5	39.7 ± 0.9	< 10
<b>L4-11</b>	31.9 ± 10.1	Нет	59.8 ± 4.3 (83.02 ± 4.3) <sup>b</sup>	Нет

<sup>a</sup> Концентрация соединения 0.1 ммоль · л<sup>-1</sup>, <sup>b</sup> эффективная концентрация — EC<sub>50</sub>.

алантолактон (**L4**), и его триптаминовые производные не влияют на мембранный потенциал митохондрий, в то время как изоалантолактон (**L2**) и его конъюаты с триптамиминами вызывают дозозависимую деполяризацию митохондрий и, соответственно, предотвращают потенциал-зависимый вход ионов кальция в митохондрии. Именно с этим, очевидно, связано и подавление в присутствии изоалантолактона или его триптаминовых аддуктов «набухания» митохондрий при добавлении ионов кальция к суспензии митохондрий, что является характеристикой процесса появления неспецифической проницаемости митохондрий (рис. 13).

Неспецифическая проницаемость митохондрий измерялась как «набухание» митохондрий, выражающееся в уменьшении оптической плотности ( $A_{540}$ ) суспензии митохондрий после добавления кальция (*a, c*); мембранный потенциал митохондрий измерялся с потенциал-зависимым индикатором сафранином (*b, d*) в присутствии

ингибитора комплекса I дыхательной цепи митохондрий ротенона ( $1 \text{ мкмоль} \cdot \text{л}^{-1}$ ) после добавления субстрата комплекса II сукцината.

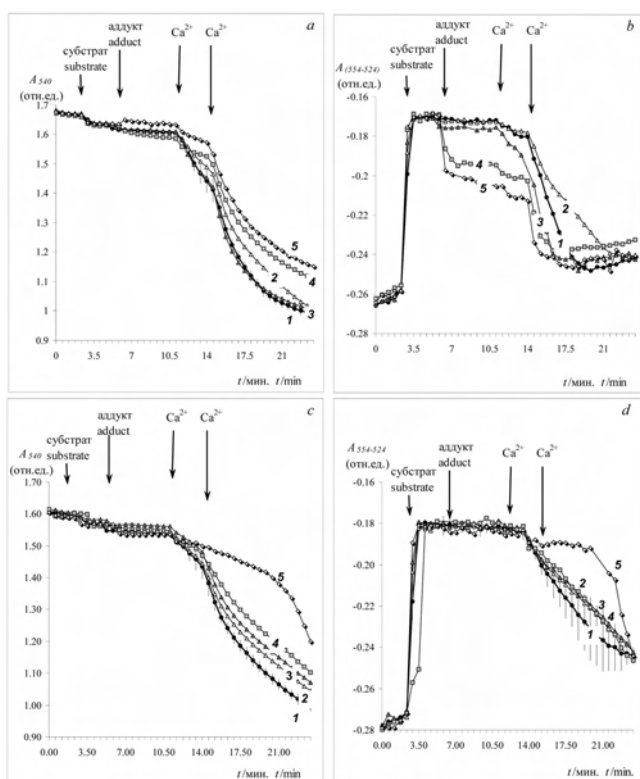
Типичные кривые, показывающие влияние соединений **L2-11** и **L4-11** на мембранный потенциал митохондрий, представлены на рис. 13*b, d*. Коррелирующее со снижением потенциала подавление «набухания» митохондрий при добавлении экзогенного кальция в присутствии изоалантолактона и его аналогов качественно не отличается от представленного на рис. 13*a* для аддукта **L2-11**. В ряду триптаминовых производных эпоксиизоалантолактона подавление кальций-индуцированного набухания митохондрий обнаружено только для соединения **L4-11** (рис. 13*c*).

Следовательно, триптаминовые производные алантолактонов представляют интерес как эффективные антиоксиданты, хелатирующие агенты для иона железа и митопротекторы.

### 5.12. Цитотоксичность аминопроизводных дегидросантонина

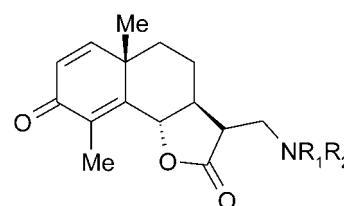
После формирования в молекуле сантонина (**L26**) экзоциклической двойной связи были синтезированы различные аминопроизводные дегидросантонина **L28** и исследовано их цитотоксическое действие на культурах опухолевых клеток человека *in vitro* проводили с помощью МТА-анализа (Microculture Tetrazolium Assay) [54]. Исследования проводили на двух клеточных культурах опухолей человека — меланоме человека (линия MS) и аденокарциноме яичников человека (линия CaOv). Результаты исследования сесквитерпеновых лактонов и их синтетических производных на культурах опухолевых клеток человека представлены в табл. 16.

Оказалось, что большинство изученных производных обладают умеренной цитотоксической активностью. Наибольшую активность проявляли соединения **L28-34**, **L28-35**, **L28-37**, **L28-43** и **L28-45** — конъюаты дипропиламина (в виде



**Рис. 13.** Влияние аддуктов **L2-11** (*a, b*) и **L4-11** (*c, d*) на характеристики митохондрий.

Добавки: субстрат —  $0.5 \text{ ммоль} \cdot \text{л}^{-1}$  сукцинат;  $\text{Ca}^{2+}$  —  $\text{CaCl}_2$  — первая добавка  $6.25 \text{ нмоль} \cdot \text{мл}^{-1}$ , вторая добавка —  $12.5 \text{ нмоль} \cdot \text{мл}^{-1}$ . Концентрации добавленных аддуктов ( $\text{мкмоль} \cdot \text{л}^{-1}$ ): 1 — 0; 2 — 1; 3 — 10; 4 — 50; 5 — 100.



L28-11, L28-23, L28-32--L28-45

**Таблица 16.** Цитотоксическое действие аминокпроизводных сантонина в отношении культур опухолевых клеток меланомы (MS) и аденокарциномы яичка (CaOv) человека.

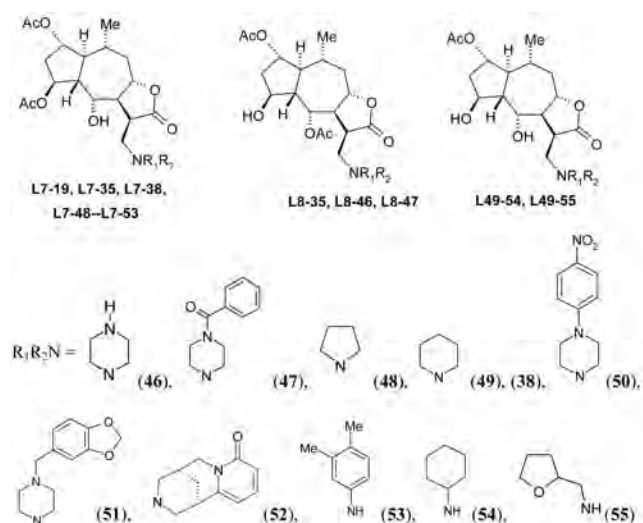
Соединение	NR <sub>1</sub> R <sub>2</sub>	Линия MS, GI <sub>50</sub> <sup>a</sup>	Линия CaOv, GI <sub>50</sub> <sup>a</sup>
L28-32		$>1 \cdot 10^{-5}$	$>1 \cdot 10^{-5}$
L28-33		$>1 \cdot 10^{-5}$	$3 \cdot 10^{-6}$
L28-11		$>1 \cdot 10^{-5}$	$>1 \cdot 10^{-6}$
L28-34		$4 \cdot 10^{-6}$	$2 \cdot 10^{-6}$
L28-23		$>1 \cdot 10^{-5}$	$8 \cdot 10^{-6}$
L28-35		$3 \cdot 10^{-7}$	$4 \cdot 10^{-7}$
L28-36		$3 \cdot 10^{-6}$	$2 \cdot 10^{-6}$
L28-37		См. <sup>b</sup>	См. <sup>b</sup>
L28-38		$>1 \cdot 10^{-5}$	$>1 \cdot 10^{-5}$
L28-39		$3 \cdot 10^{-6}$	$>1 \cdot 10^{-5}$
L28-40		$5 \cdot 10^{-6}$	$9 \cdot 10^{-6}$
L28-41		$3 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-6}$
L28-42		$>1 \cdot 10^{-5}$	$3 \cdot 10^{-6}$
L28-43		$3 \cdot 10^{-6}$	$3 \cdot 10^{-6}$
L28-44		$>1 \cdot 10^{-5}$	$>1 \cdot 10^{-5}$
L28-45		$2 \cdot 10^{-6}$	$4 \cdot 10^{-6}$

<sup>a</sup> Концентрация исследуемого препарата (в мкмоль · л<sup>-1</sup>), вызывающая 50%-ное торможение скорости роста клеток в культуре; <sup>b</sup> нет данных.

гидрохлорида), морфолина и замещенных пиперидина и пиперазинов, причем в отношении обеих клеточных линий опухолей человека. Это дает основание для дальнейшего поиска цитотоксических соединений в ряду аминокпроизводных сантонина.

### 5.13. Противоопухолевая активность аминокпроизводных гваянолового ряда

С помощью МТА-анализа *in vitro* на культурах опухолевых клеток человека RD были протестированы аминокпроизводные трех гваянолоидов — британина (L7) и иннучиненолида С (L8), выделенных из растения *I. britannica*, а также их дезацетилированного аналога L49, образующегося в процессе реакций с некоторыми аминами [64]. В качестве N-нуклеофилов был использован широкий ряд первичных и вторичных аминов (19, 35, 38, 46–55), включая представителя ароматического ряда — 3,4-ксилидин (53). Результаты исследований представлены в табл. 17.



Видно, что большинство изученных аминокпроизводных гваянолоидов L7, L8 и L49 обладают умеренной цитотоксической активностью, за исключением продуктов 4j,k, 5c, 6l, которые

**Таблица 17.** Цитотоксическое действие гваянолоидов и их аминокпроизводных на культурах опухолевых клеток (IC<sub>50</sub>, мкМ).

Соединение	Клеточная линия		
	RD	MCF7	MS
L7	19.98 ± 1.99	43.24 ± 3.02	58.66 ± 2.62
L8	40.45 ± 2.05	88.75 ± 2.46	91.20 ± 25.78
L7-35	117.28 ± 0.15	—	140.92 ± 14.19
L7-48	94.98 ± 1.97	104.73 ± 1.43	93.70 ± 2.17
L7-49	57.21 ± 5.07	128.17 ± 7.55	...
L7-38	57.87 ± 0.28	94.91 ± 0.14	79.27 ± 4.02
L7-50	125.09 ± 9.40	—	—
L7-51	98.87 ± 0.68	—	154.27 ± 3.28
L7-52	119.06 ± 0.96	—	—
L8-35	114.92 ± 1.81	—	—
L49-55	69.81 ± 8.36	159.79 ± 32.44	—

оказались нетоксичными для исследованных клеточных линий. Таким образом, полученные результаты дают основание для создания эффективных препаратов противоопухолевого действия и в этом ряду соединений.

#### 5.14. Исследование противоопухолевой активности нового сесквитерпенового лактона L14

Новый сесквитерпеновый лактон **L14** был выделен из растения гайлардия крупноцветковая. Расширенное исследование его антипролиферативной активности проводили на панели из 60 линий опухолевых клеток, куда входили линии опухолевых клеток меланом, опухолей ЦНС, немелкоклеточного рака легких, лейкемии, рака яичников, прямой кишки, толстой кишки, простаты, молочной железы. Проведенное исследование показало наличие специфичности действия данного соединения. Так, для большинства линий опухолевых клеток лактон **L14** не обладал значимой цитотоксичностью. В то же время для некоторых линий меланом, рака толстой кишки, опухолей ЦНС и немелкоклеточного рака легких его антипролиферативная активность находилась в диапазоне  $10^{-7}$ – $10^{-8}$  М (рис. 14).

Поскольку данный лактон представлялся достаточно перспективным для разработки на его основе эффективных антинеопластов, было проведено исследование его противоопухолевой активности *in vivo*. Исследования проводили на нескольких рецидивирующих и метастазирующих опухолях — аденокарциноме 755 и меланоме В16. Рецидивирующая после комбинированной химиотерапии меланомы В16 является моделью наиболее часто встречающегося в клинике рецидива заболевания в целом, включающего как местный рецидив, так и отдаленные

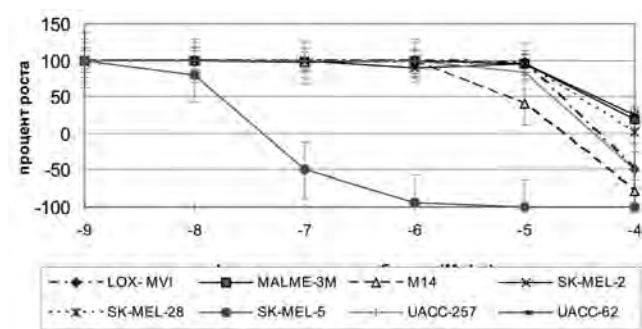


Рис. 14. Антипролиферативная активность соединения L14 в отношении различных линий опухолевых клеток меланом.

метастазы, возникающие или проявляющиеся после лечения. Рецидивирующая после комбинированной химиотерапии аденокарцинома 755 соответствует клинической ситуации, когда после одного и того же курса лечения небольшая часть больных излечивается, а у остальных возникают ранние и поздние рецидивы опухолей. Аденокарцинома Ca 755 поддерживалась на мышцах C57BC/6, для опытов трансплантировали по 0.3 мл гомогената опухолевой ткани в разведении 1 : 2 s.c. Меланомы В16 поддерживалась на мышцах C57BC/6, для опытов трансплантировали по  $10^5$  клеток. Результаты исследований представлены в табл. 18, 19.

Таблица 18. Активность лактона L14 в отношении рецидивирующей аденокарциномы 755.

Доза, мг/кг	Режим (дни введения)	ILS, %	Выжившие животные
10	18–26	59	1/10
5	18–26	75	1/8

Таблица 19. Активность лактона L14 в отношении метастазирующей меланомы В16.

Доза, мг/кг	Режим (дни)	Ингибирование роста опухоли, %	Ингибирование метастазирования, %
10	1–9 сутки	86	84
5	1–11 сутки	76	72

Представленные в табл. 18, 19 данные биологических исследований лактона **L14** подтверждают полученные ранее результаты о перспективности данного соединения, которое оказывает значительное воздействие как на рост первичных опухолей, так и на развитие метастазов. При введении этого лактона имеются выжившие животные, что наблюдается только в случае довольно активных противоопухолевых препаратов.

## 6. Заключение

При проведении комплексного исследования сесквитерпеновых лактонов растений семейства Сложноцветных (Asteraceae) изучен химический состав 9 растений, из которых выделено 22 сесквитерпеновых лактона. При этом разработаны оптимальные методы извлечения таких соеди-



нений из растительного сырья. В результате доступные природные сесквитерпеновые лактоны наработаны в препаративных количествах.

Для модификации исходных лактонов использованы различные подходы, в том числе введение функциональных групп, трансформация углеродного скелета, создание в молекуле новых реакционных центров. Путем осуществления аза-реакции Михаэля с участием активированной экзометиленовой группы в лактонном цикле с N-нуклеофилами получено более 200 гибридных молекул, которые содержат два биологически активных фрагмента — природного сесквитерпенового лактона и фармакофорного амина, включая компоненты известных лекарственных препаратов.

При исследовании антипролиферативной активности природных сесквитерпеновых лактонов и гибридных молекул на их основе показано наличие как высокой цитотоксичности для линий опухолевых клеток, так и специфичности (избирательности) их действия. Большое внимание уделяется установлению механизмов противоопухолевого действия синтезированных соединений. Предположительно, противоопухолевая активность сесквитерпеновых лактонов и их производных связана с ингибированием фермента фарнезилтрансферазы ( $IC_{50}$  в диапазоне 0.3–5  $\mu$ M) и с модуляцией сигнального пути Ras/MAPK/PI3K. Цитотоксическое действие таких соединений чаще всего реализуется через индукцию апоптоза. Характерной особенностью ряда гибридных молекул является активация апоптоза в обход сигнальных путей белка p53 и без участия АФК.

В экспериментах *in vivo* с участием неизвестного ранее сесквитерпенового лактона **L14** на рецидивирующих и метастазирующих опухолях — аденокарциноме 755 и меланоме B16 — установлена его эффективность как при ингибировании метастазирования, так и в отношении увеличения продолжительности жизни животных.

Синтезирован большой ряд конъюгатов сесквитерпеновых лактонов с антрациклиновыми антибиотиками. Такие соединения обладают заметной антипролиферативной активностью, превосходящей активность исходных природных молекул, при этом они сохраняют невысокую

цитотоксичность в отношении нормальных клеток.

Таким образом, представленный выше материал убедительно свидетельствует в пользу перспективности разработки на основе природных сесквитерпеновых лактонов эффективных и селективных антинеопластов с антипролиферативным и проапоптотическим действием, действующих через активацию Ras/MAPK-PI3K сигнального каскада регуляции апоптоза.

Работа выполнена в рамках Госзадания 0090-2017-0018.

## Литература

1. G.Romeo, U.Chiacchio, A.Corsaro, P.Merino. *Chem. Rev.*, **110**, 3337–3370 (2010)
2. M.Hajdich, L.Havlieek, J.Vesely, R.Novotny, V.Mihal, M.Strnad. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **457**, 341–353 (1999)
3. L.C.López-Cara, A.Conejo-García, J.A.Marchal, G.Macchione, O.Cruz-López, H.Boulaiz, M.García, F.Rodríguez-Serrano, A.Ramírez, C.Cativiela, A.I.Jiménez, J.M.García-Ruiz, D.Choquesillo-Lazarte, A.Aránega, J.Campos. *Eur. J. Med. Chem.*, **46**, 249–258 (2011)
4. S.G.Klochkov, M.E.Neganova, N.Sastry Yarla, M.Parvathaneni, B.Sharma, V.V.Tarasov, G.E.Barreto, S.O.Bachurin, G.Ashraf, G.Aliev. *Sem. Cancer Biol.*, (2017) (in the press); <http://doi.org/10.1016/j.semcancer.2017.10.010>
5. P.G.Grothaus, G.M.Cragg, D.J.Newman. *Curr. Org. Chem.*, **14**, 1781–1791(2010)
6. D.J.Newman, G.M.Cragg. *Future Med. Chem.*, **1**, 1415–1427 (2009)
7. A.L.Harvey. *Trends Pharmacol. Sci.*, **20** (5), 196–198 (1999)
8. G.M.Cragg, D.J.Newman. *Biochim. Biophys. Acta*, **1830**, 3670–3695 (2013)
9. D.J.Newman, G.M.Cragg. *J. Nat. Prod.*, **75**, 311–335 (2012)
10. E.A.Curry 3rd, D.J.Murry, C.Yoder, K.Fife, V.Armstrong, H.Nakshatri, M.O'Connell, C.J.Sweeney. *Invest. New Drugs*, **22** (3), 299–305 (2004)
11. S.Pei, M.Minhajuddin, K.P.Callahan, M.Balys, J.M.Ashton, S.J.Neering, E.D.Lagadinou, C.Corbett, H.Ye, J.L.Liesveld, K.M.O'Dwyer, Z.Li, L.Shi, P.Greninger, J.Settleman, C.Benes, F.K.Hagen, J.Munger, P.A.Crooks, M.W.Becker, C.T.Jordan. *J. Biol. Chem.*, **288** (47), 33542–33558 (2013)
12. D.Mahalingam, G.Wilding, S.Denmeade, J.Sarantopoulos, D.Cosgrove, J.Cetnar, N.Azad, J.Bruce, M.Kurman, V.E.Allgood, M.Carducci. *Br. J. Cancer*, **114** (9), 986–994 (2016)
13. P.R.Dandawate, D.Subramaniam, R.A.Jensen, S.Anant. *Semin. Cancer Biol.*, **40**, 192–208 (2016)
14. M.R.Kreuger, S.Grootjans, M.W.Biavatti, P.Vandenabeele, K.D'Herde. *Anticancer Drugs*, **23** (9), 883–896 (2012)
15. K.Gach, A.Janecka. *Anticancer Agents Med. Chem.*, **14** (5), 688–694 (2014)
16. K.S.Siveen, S.Uddin, R.M.Mohammad. *Mol. Cancer*, **16** (1), 13 (2017)

17. I.Merfort. *Curr. Drug Targets*, **12** (11), 1560–1573 (2011)
18. M.Karin, Y.Cao, F.R.Greten, Z.-W.Li. *Nat. Rev. Cancer*, **2** (4), 301–310 (2002)
19. J.-L.Luo, H.Kamata, M.Karin. *J. Clin. Invest.*, **115** (10), 2625–2632 (2005)
20. M.Khan, F.Yi, A.Rasul, T.Li, N.Wang, H.Gao, R.Gao, T.Ma. *IUBMB Life*, **64** (9), 783–794 (2012)
21. J.C.Lei, J.Q.Yu, Y.Yin, Y.W.Liu, G.L.Zou. *Food Chem. Toxicol.*, **50** (9), 3313–3319 (2012)
22. A.Klippel, C.Reinhard, W.M.Kavanaugh, G.Apell, M.-A.Escobedo, L.T.Williams. *Mol. Cell. Biol.*, **16** (8), 4117–4127 (1996)
23. A.Kauffmann-Zeh, P.Rodriguez-Viciana, E.Ulrich, C.Gilbert, P.Coffer, J.Downward, G.Evan. *Nature*, **385**, 544–548 (1997)
24. Z.Han, L.Hong, Y.Han K.Wu, S.Han, H.Shen, C.Li, L.Yao, T.Qiao, D.Fan. *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, **26** (2), 261–268 (2007)
25. С.Г.Клочков, С.В.Афанасьева, Н.С.Зефилов. *Технологии живых систем*, (5–6), 31–39 (2008)
26. T.E.Shaikenov, S.M.Adekenov, R.M.Williams, N.Prashad, F.L.Baker, T.L.Madden, R.Newman. *Oncol. Rep.*, **8** (1), 173–179 (2001)
27. J.Chun, R.J.Choi, S.Khan, Y.S.Kim. *Int. Immunopharmacol.*, **14** (4), 375–383 (2012)
28. M.Khan, C.Ding, A.Rasul, F.Yi, T.Li, H.Gao, R.Gao, L.Zhong, K.Zhang, X.Fang, T.Ma. *Int. J. Biol. Sci.*, **8** (4), 533–547 (2012)
29. E.Buytaert, M.Dewaele, P.Agostinis. *Biochim. Biophys. Acta*, **1776** (1), 86–107 (2007)
30. A.Hanikoglu, F.Hanikoglu, T.Ozben. *Curr. Protein Pept. Sci.*, **19** (3), 333–340 (2018)
31. S.J.Crabb, M.Howell, H.Rogers, M.Ishfaq, A.Yurek-George, K.Carey, B.M.Pickering, P.East, R.Mitter, S.Maeda, P.W.Johnson, P.Townsend, K.Shin-ya, M.Yoshida, A.Ganesan, G.Packham. *Biochem. Pharmacol.*, **76**, 463–475 (2008)
32. S.Tan, Z.P.Liu. *ChemMedChem.*, **10** (3), 441–450 (2015)
33. Y.N.Gopal, T.S.Arora, M.W.Van Dyke. *Chem. Biol.*, **14** (7), 813–823 (2007)
34. R.A.Gatenby, R.J.Gillies. *Nat. Rev. Cancer*, **4**, 891–899 (2004)
35. J.W.Kim, I.Tchernyshyov, G.L.Semenza, C.V.Dang. *Cell Metab.*, **3** (3), 177–185 (2006)
36. D.R.Plas, C.B.Thompson. *Trends Endocrinol. Metab.*, **13**, 75–78 (2002)
37. J.W.Kim, C.V.Dang. *Trends Biochem. Sci.*, **30**, 142–150 (2005)
38. C.V.Dang, J.W.Kim, P.Gao, J.Yustein. *Nat. Rev. Cancer*, **8**, 51–56 (2008)
39. A.Yalcin, S.Telang, B.Clem, J.Chesney. *Exp. Mol. Pathol.*, **86**, 174–179 (2009)
40. C.M.Jenkins, J.Yang, H.F.Sims, R.W.Gross. *J. Biol. Chem.*, **286**, 11937–11950 (2011)
41. J.H.Lee, R.Liu, J.Li, C.Zhang, Y.Wang, Q.Cai, X.Qian, Y.Xia, Y.Zheng, Y.Piao, Q.Chen, J.F. de Groot, T.Jiang, Z.Lu. *Nat. Commun.*, **8** (1), 949 (2017)
42. A.Kueck, A.W.Opipari Jr., K.A.Grif?th L.Tan, M.Choi, J.Huang, H.Wahl, J.R.Liu. *Gynecol. Oncol.*, **107**, 450–457 (2007)
43. H.Deng, F.Yu, J.Chen, Y.Zhao, J.Xiang, A.Lin. *J. Biol. Chem.*, **283**, 20754–20760 (2008)
44. L.S.Gomez, P.Zancan, M.C.Marcondes et al. *Biochimie*, **95**, 1336–432013
45. E.Mochiki, H.Kuwano, H.Katoh, T.Asao, N.Oriuchi, K.Endo. *World J. Surg.*, **28**, 247–253 (2004)
46. N.Zamzami, G.Kroemer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2**, 67–71 (2001)
47. E.D.Michelakis, L.Webstel, J.R.Mackey. *Br. J. Cancer*, **99**, 989–994 (2008)
48. S.Bonnet, S.L.Archer, J.Allalunis-Turner, A.Haromy, C.Beaulieu, R.Thompson, C.T.Lee, G.D.Lopaschuk, L.Puttagunta, S.Bonnet, G.Harry, K.Hashimoto, C.J.Porter, M.A.Andrade, B.Thebaud, E.D.Michelakis. *Cancer Cell.*, **11** (1), 37–51 (2007)
49. K.Zaima, D.Wakana, Y.Demizu, Y.Kumeta, H.Kamakura, T.Maruyama, M.Kurihara, Y.Goda. *J. Nat. Med.*, **68** (2), 432–435 (2014)
50. S.H.Lone, K.A.Bhat, Shakeel-u-Rehman, R.Majeed, A.Hamid, M.A.Khuroo. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **23** (17), 4931–4934 (2013)
51. A.Taleghani, M.A.Nasseri, M.Iranshahi. *Bioorg. Chem.*, **71**, 128–134 (2017)
52. S.G.Klochkov, S.V.Afanaseva, A.N.Pushin. *Chem. Nat. Compd.*, **42** (4), 325–330 (2006)
53. V.Herout, M.Suchy, F.Sorn. *Coll. Czech. Chem. Commun.*, **26** (2), 2612 (1961)
54. S.G.Klochkov, S.V.Afanaseva, A.N.Pushin, G.K.Gerasimova, N.K.Vlasenkova, Yu.N.Bulychev. *Chem. Nat. Compd.*, **45** (6), 817–823 (2009)
55. С.Г.Клочков, С.А.Пухов, С.В.Афанасьева, А.Н.Пушин, О.В.Новикова, И.М.Бравова. В кн. *Химия гетероциклических соединений. Современные аспекты. Т. 1.* (Под ред. В.Г.Карцева). МБФНП (ICSPF Press), Москва, 2014. С. 268–272
56. С.Г.Клочков, С.А.Пухов, С.В.Афанасьева, А.Н.Пушин, О.В.Новикова, И.М.Бравова. В кн. *Химия гетероциклических соединений. Современные аспекты. Т. 1.* (Под ред. В.Г.Карцева). МБФНП (ICSPF Press), Москва, 2014. С. 273–279
57. S.G.Klochkov, I.V.Anan'ev, S.A.Pukhov, S.V.Afanaseva. *Chem. Nat. Compd.*, **49** (3), 533–534 (2013)
58. H.Yoshioka, T.J.Mabry, N.Dennis, W.Herz. *J. Org. Chem.*, **35**, 627 (1970)
59. I.Kitagawa, H.Shibuya, M.Kawai. *Chem. Pharm. Bull.*, **25**, 2638 (1977)
60. A.V.Semakov, S.V.Afanaseva, S.G.Klochkov. *Chem. Nat. Compd.*, **52**, 943 (2016)
61. С.А.Пухов, М.Е.Неганова, Л.В.Аникина, Е.Ф.Шевцова, С.В.Афанасьева, С.Г.Клочков. *Фундаментальные исследования*, № 9 (часть 9), 1988–1992 (2014)
62. Л.В.Аникина, А.В.Семаков, С.В.Афанасьева, С.А.Пухов, С.Г.Клочков. *Хим.-фарм. журн.*, **52** (4), 23–26 (2018)
63. Л.В.Аникина, А.В.Семаков, С.А.Пухов, С.В.Афанасьева, С.Г.Клочков. *Современные проблемы науки и образования*, (2), 11 (2016)
64. S.G.Klochkov, S.A.Pukhov, S.V.Afanaseva, L.V.Anikina, A.V.Ermatova. *Chem. Nat. Compd.*, **51** (3), 435–443 (2015)
65. S.G.Klochkov, I.V.Anan'ev, S.A.Pukhov, S.V.Afanaseva. *Chem. Heterocycl. Compd.*, **48** (5), 698–703 (2012)
66. S.G.Klochkov, S.V.Afanaseva, S.A.Pukhov. *Chem. Heterocycl. Compd.*, **48** (2), 384–385 (2012)

67. A.V.Semakov, L.V.Anikina, S.A.Pukhov, S.V.Afanasieva, S.G.Klochkov. *Chem. Nat. Compd.*, **52** (4), 695–696 (2016)
68. T.Mosmann. *J. Immunol. Methods*, **65**, 55–63 (1983)
69. M.M.Nociari, A.Shalev, P.Benias, C.Russo. *J. Immunol. Methods*, **213**, 157–167 (1998)
70. S.N.Rampersad. *Sensors*, **12** (9), 12347–12360 (2012)
71. М.Е.Неганова, В.А.Блик, С.Г.Клочков, Н.Е.Чепурнова, Е.Ф.Шевцова. *Нейрохимия*, **28** (3), 236–243 (2011)
72. R.Apak, K.Guclu, M.Ozyurek, S.E.Karademir. *J. Agricult. Food Chem.*, **52**, 7970–7981 (2004)
73. K.Jiang, D.Coppola, N.C.Crespo, S.V.Nicosia, A.D.Hamilton, S.M.Sehti, J.Q.Cheng. *Mol. Cell. Biol.*, **20** (1), 139–148 (2000)
74. J.Sakowski, M.Bohm, I.Sattler, H.-M.Dahse, M.Schlitzer. *J. Med. Chem.*, **44**, 2886–2899 (2001)
75. W.Du, G.C.Prendergast. *Cancer Res.*, **59**, 5492–5496 (1999)
76. P.A.Konstantinopoulos, M.V.Karamouzis, A.G.Papavassiliou. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **6**, 541–555 (2007)
77. J.E.Chipuk, T.Kuwana, L.Bouchier-Hayes, N.M.Droin, D.D.Newmeyer, M.Schuler, D.R.Green. *Science*, **303** (13), 1010–1014 (2004)
78. J.D.Amaral, J.M.Xavier, C.J.Steer, C.M.Rodrigues. *Discov. Med.*, **45** (9), 145–152 (2010)
79. A.Rasul, J.Di, F.M.Millimouno, M.Malhi, I.Tsuji, M.Ali, J.Li, X.Li. *Molecules*, **18**, 9382–9396 (2013)
80. S.G.Klochkov, S.V.Afanas'eva, Yu.N.Bulychev, M.E.Neganova, E.F.Shevtsova. *Russ. Chem. Bull., Int. Ed.*, **61** (2), 409–415 (2012)
81. S.G.Klochkov, S.V.Afanas'eva, A.B.Ermatova, A.V.Chudinov. *Chem. Nat. Compd.*, **47** (5), 716–725 (2011)
82. R.S.G.Jones. *Prog. Neurobiol.*, **19**, 117 (1982)
83. S.Millán-Plano, E.Piedrafita, F.J.Miana-Mena, L.Fuentes-Broto, E.Martínez-Ballarín, L.López-Pingarrón, M.A.Sáenz, J.J.García. *Int. J. Mol. Sci.*, **11**, 312 (2010)

# Природные соединения растительного происхождения в противоопухолевой терапии

С.А.Пухов, С.В.Афанасьева, С.Г.Клочков

*Лаборатория природных соединений ИФАВ РАН*

## 1. Введение

В последние десятилетия для лечения злокачественных опухолей как дополнение к традиционным методикам широкое распространение получило новое направление онкологии — экспериментальные методы. Но, несмотря на значительные успехи в данной области, количество положительно диагностируемых на предмет наличия данного типа заболеваний пациентов неуклонно растет, а в списке причин смертности онкозаболевания находятся на втором месте (14.3%) после сердечно-сосудистых патологий (56.8%). За последние 10 лет количество онкологических больных в мире увеличилось на 14%. Так, в 2010 году в России было выявлено 516 874 новых случаев злокачественных новообразований. Общее же число больных, стоящих на диспансерном учете в территориальных специализированных онкологических учреждениях, составляет более 2 800 000 чел., а число летальных исходов от злокачественных новообразований превысило 290 000 за год [1].

В связи с этим все более остро ставится вопрос о создании принципиально новых подходов к лечению онкологических больных, минуя или снижая негативные последствия хирургического вмешательства. Одним из путей является внедрение в практическую терапию современных экспериментальных методов. Из наиболее перспективных стоит выделить следующие:

— генная терапия, которая заключается во введении в опухоль генов, заставляющих клетки гибнуть (самопроизвольно или под влиянием химиотерапии) или не дающих им размножаться;

— применение ангиостатических лекарств, которые препятствуют образованию капилляров в опухоли, после чего опухолевые клетки погибают, лишены доступа крови;

— биохимическое подавление роста и развития опухолевых клеток.

Настоящая работа посвящена применению растительных лекарственных средств в терапии злокачественных опухолей. Вначале представлен краткий обзор истории решения данной проблемы, при этом особое внимание уделено лечению рака в России. Основной акцент работы сделан на анализе современных препаратов, разработанных на основе природных веществ.

## 2. Основные пути поиска противоопухолевых средств на основе природных соединений

До XVIII века рак лечили в основном с помощью средств растительного происхождения. В травниках и лечебниках для лечения опухолевых заболеваний рекомендовались такие травы как: аронник пятнистый, аконит ядовитый, дивала однолетняя, норичник шишковатый, зверобой обыкновенный, лавровишня, молочай острый, ноготки лекарственные, омела белая, подорожник большой, полынь волосовидная, чистотел большой и др. Приведенный перечень далеко не исчерпывает всего количества растений, предлагаемых народной медициной [2 – 5].

В настоящее время накоплено достаточно большое число фактов, чтобы признать перспективной терапию рака препаратами из лекарственных растений. С их помощью нередко удается получить терапевтический эффект и при генерализации опухолевого процесса, и при

---

С.А.Пухов. Кандидат химических наук, научный сотрудник лаборатории природных соединений.

e-mail: pukhov.sergey@gmail.com

С.В.Афанасьева. Кандидат химических наук, старший научный сотрудник той же лаборатории.

e-mail: svafa@ipac.ac.ru

С.Г.Клочков. Кандидат биологических наук, главный научный сотрудник, заведующий той же лабораторией.

e-mail: klochkov@ipac.ac.ru

наличии обширного метастазирования, когда хирургическое вмешательство и лучевое воздействие не приводят к желаемым результатам или вовсе не применимы. Большинство онкологов (Е.М.Вермель, Н.Н.Блохин, Л.Ф.Ларионов, В.А.Чернов, Н.И.Переводчикова и др.) считали терапию опухолей природными соединениями, в частности химиотерапию, чрезвычайно необходимым и перспективным направлением [6, 7].

Можно выделить два основных пути, по которым идет изучение противоопухолевых лекарственных средств: 1) специфическое влияние непосредственно на клетки злокачественных опухолей и 2) воздействие лекарственными веществами на организм в целом.

Первый путь основан на том, что злокачественная ткань, как быстроделющаяся, обладает повышенной чувствительностью к антимитотическим лекарственным агентам; кроме того, некоторые особенности внутриклеточного метаболизма, отличающие трансформированную клетку от нормальной, также открывают перспективу для поиска средств, являющихся анти-метаболитами по отношению к опухолевой клетке.

Второй путь, ведущий к усилению собственных защитных сил организма по отношению к процессу злокачественного роста, основан на утвердившейся точке зрения, что рак есть заболевание всего организма и что появление опухоли вызвано местным выражением патологического состояния, в патогенезе которого играют роль нарушения функций нейроэндокринной регуляции и обменных процессов всего организма. Действительно, в настоящее время имеется ряд экспериментальных данных, свидетельствующих о том, что воздействие на организм через нервную, эндокринную системы, систему соединительной ткани изменяет скорость и характер роста экспериментально вызванных опухолей и оказывает влияние на интенсивность и локализацию процессов метастазирования [8].

Все это дает основание считать попытки направленного влияния на бластомный процесс путем воздействия на опухолевую клетку, с одной стороны, и на функциональное состояние различных органов и систем организма — с другой, вполне оправданными.

Многие годы поиски противоопухолевых препаратов — как синтетических, так и природных — носили чисто эмпирический характер. И только в последние десятилетия биологи и патологи стали опираться на определенные представления о механизме действия различных препаратов на нормальные и злокачественные ткани организма, а также на его защитные реакции. Опубликован ряд работ, посвященных выяснению природы физиологически активных веществ, которые содержатся в растениях. Растения были разбиты на группы, содержащие алкалоиды, гликозиды, эфирные масла, витамины и пигменты, дубильные вещества, ядовитые безазотистые соединения, производные пуринов, микроэлементы и другие вещества, обладающие определенной физиологической активностью.

В настоящее время стало понятно, что поиск растений, обладающих противоопухолевой активностью, нужно вести не эмпирически, а путем учета механизмов действия различных веществ на целостный организм и на злокачественно трансформированную клетку.

### 3. Примеры применения препаратов растительного происхождения

Сильным кариокластическим ядом, обладающим антимитотической активностью, является подофиллин, получаемый из корневищ подофилла щитовидного — *Podophyllum peltatum* L. и подофилла гималайского — *Podophyllum emodi* Wall., сем. *Berberidaceae* (барбарисовые) (рис. 1).

Препарат оказывает на клетки опухолей двойное токсическое действие, поражая одновременно ядро и цитоплазму. Согласно данным клинических наблюдений опухолевая ткань реагирует на воздействие подофиллином гораздо сильнее, чем нормальные ткани, в которых развивается только гиперемия. Спиртовые растворы подофиллина (10–20%) применяют при раке кожи. Клинические наблюдения показали, что препарат также оказался эффективным у больных раком молочной железы и миелоидной лейкемией и приводил в ряде случаев к полному излечению; в то же время при аденокарциноме мочевого пузыря подофиллин не дал никакого эффекта. Обнаружена высокая эффективность подофиллина при лечении острых кондилом, а

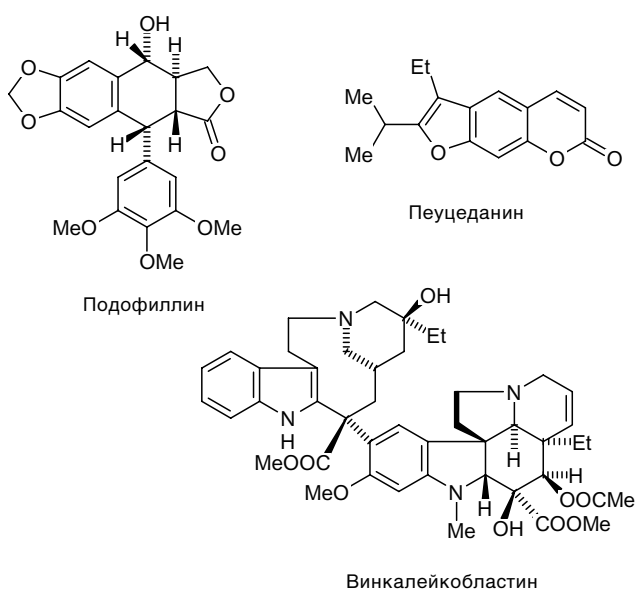


Рис. 1. Структуры подофилина, пеucedанина, винкалейкобластина.

также папиллом. Механизм действия подофилина на папилломы объясняют различно: подофилин действует раздражающе на мелкие кровеносные сосуды, вызывая спазмы, в результате чего происходит нарушение питания и отмирание ткани папилломы; подофилин действует непосредственно на клетки папилломы. Последнее подтверждается гистологическими исследованиями, при которых наблюдаются сморщенная эозинофильная цитоплазма и пикнотические ядра или вздутая базофильная цитоплазма, изменение клеточных оболочек, уменьшение числа или отсутствие межклеточных мостиков, периферическая или перинуклеарная вакуолизация цитоплазмы и измененные ядра, имеющие сходство с abortивным митозом («подофиллиновые клетки») [9].

Цитостатики на основе подофилина (препараты SPG-827, SPI-77, VM-26, VP-16213 и др.) задерживают деление клетки в ранней стадии метафазы, что и обуславливает противоопухолевый эффект, который наблюдали исследователи и который позволил зарубежным ученым сделать вывод о перспективности применения этих препаратов в комплексной терапии злокачественных новообразований.

Так как из-за высокой токсичности в организме не удастся создать достаточной терапевтической концентрации препаратов на основе колхицина, омаина и подофилина, ведется по-

иск веществ, повышающих эффективность агентов с противоопухолевым действием. Например, из растений рода горичник — *Peucedanum* Z., сем. *Urabelliferae* (зонтичные) был выделен фурукумарин — пеucedанин. Биологические исследования показали, что пеucedанин обладает известным самостоятельным противоопухолевым влиянием в опытах *in vitro* и *in vivo*. В клинике пеucedанин применяют в сочетании с ТиюТЭ-Фом, что значительно усиливает терапевтический эффект последнего.

Многочисленные работы посвящены изучению противоопухолевой активности применяющегося в клинике препарата Винбластин. Действующее вещество этого препарата — индольный алкалоид винкалейкобластин (VLB). Винкалейкобластин был выделен из барвинка розового — *Vinca rosea* L., сем. *Apocynaceae* (кутровые). В поисках активного противоопухолевого начала *Vinca rosea* исследователи обнаружили другие алкалоиды: лейрозин, вайрозин, первин, лейкокринтин (препарат Винкринтин) [10].

Изучение противоопухолевых свойств VLB в эксперименте на животных показало, что он обладает и антибластическим действием, т.е. может вмешиваться в клеточный обмен, препятствуя процессу клеточного метаболизма, идущему от глутаминовой кислоты к мочеvine и от глутаминовой кислоты к лимоннокислому циклу. Наряду с этим винкалейкобластин эффективно подавляет митозы в метафазе. Применение винкалейкобластина в клинике лимфогранулематоза, острой лейкемии, лимфорсаркомы, рака молочной железы, эпидермального рака легкого, аденокарциномы прямой кишки и других форм злокачественных заболеваний сопровождалось частичным уменьшением опухолей, ремиссиями с заметным улучшением в общей клинической картине. При генерализованном лимфогранулематозе, особенно с выраженными явлениями интоксикации, винбластин первым должен быть применен больному, а затем, по показаниям, возможно назначение лучевой и химиотерапии. В литературе имеются данные об экспериментальном и клиническом испытании и других алкалоидов барвинка розового, а также их многочисленных синтетических аналогов и производных.

Эффективность комбинации винкринтина, метотрексата, 5-фторурацила, циклофосфана и

преднизолона проверялась в клинике Онкологического научного центра АМН СССР. Комбинация эффективна у 75% больных с диссеминированным раком молочной железы, хотя ремиссии, как правило, кратковременны [8].

Новый цитостатический препарат из группы винкаалкалоидов Виндесин отличается от других винкаалкалоидов структурной модификацией остатка катарантина. Он менее токсичен, чем винбластин и винкристин, но, по-видимому, и менее активен [11].

#### 4. Лекарственные травы в лечении опухолей

В некоторых случаях выделение активного вещества из растительных экстрактов и его биологические испытания показывают, что активность присуща растению в целом, т.е. действует комплекс соединений, состав которых иногда трудно поддается количественному определению. Ниже рассмотрены примеры применения в противоопухолевой практике препаратов на основе не индивидуальных природных соединений, а их смесей.

Среди растений, которые применяются для лечения раковых заболеваний, следует отметить издавна применявшийся в онкологической клинике чистотел — *Chelidonium majus L.*, сем. *Papaveraceae* (маковые). Установлено, что в химический состав чистотела входит ряд алкалоидов — хелеритрин, хелидонин, гомохелидонин, протопин, сангвинарин, аллокриптонин, хелидоксантин и хелидоновая кислота.

Другим препаратом растительного происхождения, вызвавшим определенный интерес у исследователей, является препарат березового гриба чаги — *Inonotus obliquus (Pers.) Pill.*, сем. *Polyporaceae* (трутовиковые), — встречающегося в виде наростов на стволах берез. По характеру биологического действия чагу относят к активным биогенным стимуляторам, восстанавливающим ферментные системы, подавленные разными видами ингибиторов. Специфическое действие препаратов чаги на ферментные системы больных выражается в снятии токсикозов, что способствует восстановлению реактивности организма больных.

Существуют данные о противоопухолевой активности препаратов чеснока — *Allium sativum L.*, и лука — *Allium cepa L.*, сем. *Liliaceae* (лилейные) при некоторых формах предрака губы

(ограниченный и диффузный гиперкератоз, лейкоплакия, трещины, язвы и т.д.). Соединения обладают выраженной противовоспалительной активностью, свойством стимулировать жизнеспособность здоровых тканей, повышать их тенденцию к регенераторно-репаративным процессам и т.д. [12, 13].

История использования лекарственных растений для терапии многих заболеваний человека, в том числе и онкологических, уходит в глубокое прошлое. Долгое время природные соединения оставались почти единственными лекарственными средствами.

Хотя арсенал противоопухолевых средств природного происхождения довольно велик, поиски эффективных противоопухолевых препаратов среди вторичных метаболитов растений продолжаются. Интенсифицировались исследования по выделению из природных объектов соединений различных классов и их модифицирование с целью увеличения установленной в эксперименте или клинике противоопухолевой активности. В отдельное направление выдвинулось установление связи между противоопухолевой активностью вещества и его химическим строением.

В задачу онкологов должен входить не только поиск новых противоопухолевых препаратов растительного происхождения, но и выделение из растений, успешно применявшихся в народной медицине, веществ, стимулирующих деятельность различных систем и органов и улучшающих тем самым общее состояние больного (при неоперабельных или запущенных формах, в профилактической терапии предраковых заболеваний и рецидивов).

#### Литература

1. Злокачественные новообразования в России в 2010 году (заболеваемость и смертность). (Под ред. В.И.Чиссова). ФГБУ «МНИОИ им. П.А.Герцена» Минздравсоцразвития России, Москва, 2012. 260 с.
2. Н.А.Богоявленский. *Вопр. онкологии*, 1 (4), 106–111 (1995)
3. В.П.Махлаюк. *Лекарственные растения в народной медицине*. Приволж. кн. изд-во, Саратов, 2008. 853 с.
4. В.И.Чиссов. *Рос. онкол. журн.*, (3), 71–75 (1998)
5. К.П.Балицкий, А.Л.Воронцова. *Лекарственные растения и рак*. Наукова думка, Киев, 1982. 376 с.
6. Н.И.Переводчикова. В кн. *Химиотерапия злокачественных опухолей*. (Под ред. Н.П.Блохина). Медицина, Москва, 1977. С. 83–85.

7. З.П.Софьина. В кн. *Химиотерапия злокачественных опухолей*. (Под ред. Н.П.Блохина). Медицина, Москва, 1977. С. 163–168.
8. Н.Н.Блохин. *Химиотерапия злокачественных опухолей*. Медицина, Москва, 1977. 319 с.
9. В.П.Георгиевский, Н.Ф.Комиссаренко, С.Е.Дмитрук. *Биологически активные вещества лекарственных растений*. Наукова думка, Киев, 1990. 333 с.
10. A.V.da Rocha, R.M.Lopes, G.Schwartzmann. *Curr. Opin. Pharmacol.*, **1**, P. 364–369 (2001)
11. К.В.Яременко. *Природные средства против рака*. ЭЛБИ, Санкт-Петербург, 2007. 112 с.
12. *Справочник по онкологии*. (Под ред. Д.Кэссиди). ГЭОТАР-Медиа, Москва, 2010. 512 с.
13. М.Буров. *Фитотерапия в онкологии. Целебные растения и травы против рака*. (Сер. Панацея). Феникс, Москва, 2006. 224 с.



# Синтетический иммуноген для лечения опиоидной наркозависимости

М.А.Мягкова,<sup>1</sup> С.Н.Петроченко,<sup>1</sup> Е.А.Орлова,<sup>2</sup> З.В.Боброва<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Лаборатория иммунохимии физиологически активных веществ ИФАВ РАН

<sup>2</sup> Лаборатория иммунохимии МНПЦ наркологии

## 1. Введение

Создание эффективных методов лечения больных наркоманией является актуальной задачей. В первую очередь, это связано с распространенностью заболевания наркоманией и трудностью ее излечения. По оценкам ВОЗ, количество людей, употребляющих наркотики, составляет во всем мире 210 миллионов человек, или 3% из 7-миллиардного населения планеты [1]. Проблема эффективного лечения наркотической зависимости не решена ни в нашей стране, ни за рубежом [2, 3]. Задача усложняется достаточно высокой частотой возникновения рецидивов болезни. Поэтому столь важно создание лекарственных средств лечения и профилактики этого заболевания, которые помогут вернуть пациента в здоровое общество. Создание вакцин, снижающих патологическую зависимость от наркотических веществ — это принципиально новый подход в лечении наркомании [4, 5]. В настоящее время противорецидивное лечение наркомании проводится в двух направлениях. Например, при зависимости от препаратов группы опия проводят традиционное лечение с использованием блокаторов опиатных рецепторов, либо заместительную терапию (бупренорфин, метадон). Пер-

вый подход является недостаточно эффективным в долгосрочной перспективе. Второй способ вызывает побочные эффекты из-за высокой аддиктивности препаратов. Он часто требует длительного, порой пожизненного лечения. Принцип действия вакцин для лечения наркомании заключается в выработке собственного иммунитета, специфических антител, которые связывают наркотические вещества при их попадании в организм [6, 7]. Эти антитела действуют на периферическом уровне, предотвращая прохождение наркотиков через гематоэнцефалический барьер и попадание их в мозг [8, 9]. При этом уменьшается токсическое действие наркотиков на мозг. Такого рода терапия намного безопаснее, чем существующие подходы в лечении наркомании, так как указанные выше традиционные препараты действуют непосредственно на рецепторы нервных клеток головного мозга. Целью данного исследования являлась разработка синтеза иммуногена для вакцины, применяемой в терапии противорецидивного лечения зависимости от наркотических веществ группы опия.

## 2. Экспериментальная часть

Для проведения биохимических и иммунохимических исследований использовали следующие материалы и методы: кроличья сыворотка против морфина, конъюгаты овечьих антител против иммуноглобулинов кролика, меченных пероксидазой хрена, тетраметилбензидин, перекись водорода 30%, твин-20, водорастворимый карбодимид (1-циклогексил-3-(2-морфолиноди-этил)карбодимида-*мета*-N-толуолсульфокислоты) «Sigma»(США), гамма-глобулин, альбумин сыворотки крови человека. Иммуноферментный

**М.А.Мягкова.** Доктор биологических наук, профессор, заведующая лабораторией иммунохимии физиологически активных веществ ИФАВ РАН.

e-mail: m.a.myagkova@gmail.com

**С.Н.Петроченко.** Кандидат биологических наук, старший научный сотрудник той же лаборатории.

e-mail: dianark777@mail.ru

**Е.А.Орлова.** Научный сотрудник лаборатории иммунохимии МНПЦ наркологии. e-mail: dianark@mail.ru

**З.В.Боброва.** Младший научный сотрудник той же лаборатории. e-mail: dianark@mail.ru

анализ выполняли на полистирольных планшетах фирмы «Nunc» (Дания). Учет результатов иммуноферментного анализа осуществляли на спектрофотометре с вертикальным ходом луча фирмы «Thermo» (Финляндия) при длине волны 450 нм. Выделение синтетического иммуногена проводили с помощью гель-хроматографии на колонке (2 × 50 см) с сефадексом G-25 в хроматографической системе Pharmacia (Швеция). Элюирование выполняли двукратно фосфатным буфером pH 7.2 со скоростью 50 мл·ч<sup>-1</sup>. Контроль хроматографического процесса осуществляли путем измерения концентрации белка при длине волны 280 нм в спектрофотометре Genesys 10UV (Thermo Fisher Scientific, США). Количество молей гаптена, присоединенных к белку, определяли по методу, разработанному ранее [10]. Белок в растворах определяли методом Бредфорда с использованием реагента фирмы «Sigma» (США).

#### **Получение конъюгата морфина с гамма-глобулином человека (М-ГГЧ)**

К раствору 15 мг (1.3 · 10<sup>-3</sup> ммоль) гамма-глобулина в 3 мл дистиллированной воды прибавили раствор 3.8 мг (0.01 ммоль) производного 6-*O*-гемисукцината морфина в 1 мл ДМФА, охладили реакционную смесь до 0°C и при перемешивании прибавили 5 мг водорастворимого карбодиимида. Реакционную смесь выдерживали в течение 12 ч в холодильнике, выпавший осадок мочевины удалили и выделяли полученный конъюгат гель-хроматографией на Сефадексе G-25. Количество присоединенного морфина рассчитывали по данным УФ-спектров исходного белка и полученного конъюгата по изменению поглощения при 280 нм. По данным УФ-спектров, в полученном конъюгате содержалось 9 моль морфина на 1 моль белка.

Получено 13 мг (90%) конъюгата морфина с гамма-глобулином (М-ГГЧ), содержащего 9 моль морфина на 1 моль белка.

Второй вариант синтеза проводили аналогично описанному выше, но с использованием других реагентов. В качестве исходных реагентов использовали раствор 30 мг (2.5 · 10<sup>-3</sup> ммоль) гамма-глобулина в 10 мл дистиллированной воды, прибавили раствор 15 мг (0.04 ммоль) производного 6-*O*-гемисукцинат-морфина в 1.5 мл ДМФА, охладили реакцион-

ную смесь до 0°C и при перемешивании добавили 15 мг водорастворимого карбодиимида. По данным УФ-спектров, в полученном конъюгате содержалось 17 моль морфина на 1 моль белка.

Таким способом получено 27 мг (91%) конъюгата морфина с гамма-глобулином (М-ГГЧ), содержащего 17 моль морфина на 1 моль белка.

#### **Получение конъюгата морфина с сывороточным альбумином человека (М-ЧСА)**

Синтез конъюгата морфина с сывороточным альбумином человека (М-ЧСА) проводили аналогично описанному выше. При этом использовали раствор 50 мг (0.08 ммоль) сывороточного альбумина человека (ЧСА) в 15.0 мл дистиллированной воды, который смешивали с 3.0 мл ДМФА, содержащего 25 мг (0.062 ммоль) 6-*O*-сукцинилморфина, и при охлаждении по каплям прибавляли раствор 19 мг (0.055 ммоль) водорастворимого карбодиимида в 3 мл дистиллированной воды. Реакционную смесь инкубировали в течение 5 ч при 4°C. Полученный конъюгат выделяли гель-хроматографией на колонке с сефадексом G-25 и лиофильно высушивали.

Было получено 42 мг (85%) конъюгата (М-ЧСА), содержащего 15 моль морфина на 1 моль белка.

#### **Получение комплекса синтетического иммуногена конъюгата морфина с гамма-глобулином человека (М-ГГЧ) с полимерным носителем-(4-нитрофенил)-акрилатом**

К раствору 6 мг поли(4-нитрофенил)акрилата (м.м. 40 000) в 1.5 мл диметилформамида (ДМФ) добавляли по каплям при перемешивании раствор 3.8 мг конъюгата М-ГГЧ (соотношение белок:гаптен 1:9) в 500 мкл фосфатно-солевого буфера (pH 7.2). Реакционную смесь выдерживали в течение суток при 20°C, затем добавляли 20 мкл 25%-ного раствора аммиака. Растворитель упаривали в вакууме. Оставшееся масло многократно промывали эфиром. В результате проведенного синтеза получали комплекс, имеющий замещение 10:1 полимерной матрицы конъюгатом морфина с гамма-глобулином человека. Контроль за степенью замещения полимерной матрицы осуществляли спектрофотометрически по количеству образовавшегося в процессе реакции *n*-нитрофенола.

Боло получено 5.5 мг (90%) комплекса с конъюгатом морфин – гамма-глобулин человека (М-ГГЧ, соотношение белок : гаптен 1 : 9) с замещением полимер – (М-ГГЧ)1 : 10.

Аналогично описанному выше проводили синтез, используя в качестве исходного соединения 5 мг поли(4-нитрофенил)акрилата в 1 мл ДМФ и 4 мг конъюгата М-ГГЧ (соотношение белок : гаптен 1 : 17) в 800 мкл фосфатно-солевого буфера (рН 7.2). Получено 4.2 мг (94%) комплекса с конъюгатом морфин – гамма-глобулин человека (М-ГГЧ, соотношение белок : гаптен 1 : 17) с замещением полимер – (М-ГГЧ)1 : 10.

#### **Получение комплекса синтетического иммуногена конъюгата морфин – сывороточный альбумин человека (М-ЧСА) с полимерным носителем-(4-нитро-фенил)акрилатом**

Аналогично описанному выше проводили синтез, используя в качестве исходного соединения 10 мг поли(4-нитрофенил)акрилата в 4 мл ДМФ и 4 мг конъюгата М-ЧСА (соотношение белок : гаптен 1 : 15) в 1 мл фосфатно-солевого буфера (рН 7.2).

Было получено 8.7 мг (89%) комплекса с конъюгатом морфина с сывороточным альбумином человека (М-ЧСА, соотношение белок : гаптен 1 : 15) с замещением полимер – (М-ЧСА)1 : 4.

Аналогично проводили синтез с использованием в качестве исходного соединения 12 мг поли(4-нитрофенил)акрилата (м.м. 40 000) в 4 мл ДМФ и 8 мг конъюгата М-ЧСА (соотношение белок : гаптен 1 : 15) в 1.5 мл фосфатно-солевого буфера (рН 7.2). Получено 10.7 мг (90%) комплекса с конъюгатом морфина с сывороточным альбумином человека (М-ЧСА, соотношение белок : гаптен 1 : 15) с замещением полимер – (М-ЧСА) 1 : 10.

Оценку активности и специфичности полученных комплексов синтетических иммуногенов проводили методом ИФА.

Твердофазный метод ИФА включает в себя следующие этапы: иммобилизацию комплекса синтетического иммуногена, состоящего из конъюгата гаптена — производного морфина — с белковым носителем и полимерной матрицы на полистирольном планшете; связывание со специфическими антителами адсорбированного на твердой фазе синтетического иммуногена; выявление образовавшегося иммунного комплекса

с помощью антивидовых антител, меченных пероксидазой хрена; измерение ферментативной активности в образовавшемся иммунном комплексе.

Для сенсibilизации планшета приготавливали растворы каждого из указанных выше синтезированных иммуногенов, указанных в табл. 1, с концентрацией  $10 \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$  в забуференном физиологическом растворе (ЗФР) (рН 7.2). Далее антигены наносили двукратным титрованием по 100 мкл в лунку планшета в диапазоне концентраций  $0.5\text{--}8 \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$  в 0.02 М карбонатном буфере (рН 9.5) и выдерживали в течение 18 ч при температуре  $4^\circ\text{C}$ .

После сорбции планшет отмывали трижды ( $3 \times 100 \text{ мкл}$ ) 0.005%-ным раствором твин-20 в ЗФР, (рН 7.2) и вносили в лунки в двух повторах по 100 мкл исследуемой сыворотки кролика, содержащей антитела к морфину в установленном рабочем разведении 1 : 200, в ЗФР с содержанием 0.01% твин-20. Планшет инкубировали в течение 1 ч при температуре  $37^\circ\text{C}$ .

После инкубации планшет отмывали, как описано выше, и добавляли в лунки по 100 мкл раствора антивидовых антител против IgG кролика, меченных пероксидазой хрена, в рабочем разведении 1 : 2000 в ЗФР, содержащем 0.01% твин-20. Планшет инкубировали в течение 1 ч при температуре  $37^\circ\text{C}$ . Далее планшет промывали, как описано выше, и заполняли (по 100 мкл в лунку) субстратной смесью, содержащей 0.2 части ТМБ и 0.4%  $\text{H}_2\text{O}_2$  в 0.05 М фосфатно-цитратном буфере. Планшет инкубировали в течение 10 мин в темноте, затем останавливали ферментативную реакцию добавлением в лунки по 50 мкл 10%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  и измеряли оптическую плотность ( $\text{OD}_{450}$ ) на спектрофотометре при длине волны 450 нм.

По результатам ИФА проводили индивидуальную оценку взаимодействия каждого из указанных выше иммуногенов со специфическими антиморфиновыми антителами. Далее строили кривые зависимости значения оптической плотности ( $\text{OD}_{450}$ ) в ИФА от концентрации для каждого варианта конструкции полученного иммуногена. Полученные данные обрабатывали статистически с оценкой достоверности результатов, применяя t-критерий Стьюдента. Диапазон выбранных концентраций, в котором наблюдается прямо пропорциональная зависи-

**Таблица 1.** Иммуноферментный анализ специфических антител для различных вариантов синтезированных иммуногенов.

Состав иммуногена			Соотношение полимер–КМНГ	C <sub>опт</sub> (см. <sup>3</sup> )
Гаптен	Макромолекулярный носитель	Соотношение гаптен–носитель		
КМНГ – конъюгат макромолекулярного носителя с гаптеном				
Морфин	Гамма-глобулин человека	17 : 1	1 : 10	1–8
Морфин	Гамма-глобулин человека	9 : 1	1 : 10	1–5
Морфин	Сывороточный альбумин человека	5 : 1	1 : 10	1–3
Морфин	Сывороточный альбумин человека	15 : 1	1 : 10	1–4
Морфин	Сывороточный альбумин человека	15 : 1	1 : 4	1–2

<sup>a</sup> Оптимальная концентрации для комплекса синтетического иммуногена при проведении ИФА, мкг · мл<sup>-1</sup>

мость оптической плотности в ИФА от концентрации иммуногена, представлен в табл. 1.

### 3. Результаты и обсуждение

Субстанция иммуногена является основным компонентом вакцины. Разработке методов ее получения и оценке иммуногенной активности посвящено данное исследование. Новизна конструирования вакцин состоит не только в создании искусственных макромолекул, обладающих необходимыми антигенными детерминантами, но и в принципиальной возможности регулировать активность этих молекул. Иммуногенность вакцинного препарата зависит от ряда параметров, в первую очередь, от антигенной структуры субстанции, а для низкомолекулярных антигенов (гаптен) — от их эпитопной плотности. Конструкция разработанного синтетического иммуногена представляет комплекс, состоящий из конъюгата макромолекулярного носителя в виде природного белка и гаптена — наркотического соединения группы опиата (морфина), ковалентно связанного с поли(4-нитрофенил)акрилатом. Макромолекулярным носителем в конъюгате является белок сыворотки крови человека (гамма-глобулин человека (ГГЧ), человеческий сывороточный альбумин (ЧСА)), который минимизирует побочные реакции при вакцинации. При разработке конструкции синтетического иммуногена изучено связывание различных комбинаций перечисленных выше конъюгатов и полимерной матрицы. Первоначально осуществлено получение карбоксилсодержащего произ-

водного морфина путем взаимодействия с янтарным ангидридом в абсолютном растворителе. Далее в присутствии водорастворимого карбодимида проведено ковалентное связывание спейсер-содержащего морфина с указанными макромолекулярными носителями. В полученных конъюгатах соотношение мор-

фина и макромолекулярного носителя составляет 9–17 моль гаптена на 1 моль носителя, при этом замещение полимерной матрицы конъюгатом находится в диапазоне 4–10 моль конъюгата на 1 моль полинитрофенилакрилата.

Методом иммуноферментного анализа (ИФА) проводили исследование эпитопной доступности и специфичности антигенных детерминант в синтезированных иммунных комплексах. В качестве инструмента использовали иммунную сыворотку, содержащую специфические антитела к опиатам. Для каждого варианта конструкции синтетического иммуногена выбрали диапазон концентраций, при котором наблюдается прямо пропорциональная зависимость изменения OD<sub>450</sub> в ИФА от разведения антигена, иммобилизованного на планшете. Результаты анализа представлены в табл. 1.

Для иммуногенов, состоящих из конъюгатов ГГЧ, содержащих морфин в диапазоне от 9 : 1 до 17 : 1 моль гаптена на 1 моль ГГЧ, установлен в ИФА оптимальный диапазон концентраций — 1–8 мкг · мл<sup>-1</sup> для комплекса №1 и 1–5 мкг · мл<sup>-1</sup> для комплекса №2. Доступность антигенных детерминант не экранируется при связывании с синтетическим полимером в соотношении 1 : 10. В этом случае значение имеет только исходное насыщение гаптеном ГГЧ. Так, при сравнении результатов ИФА, полученных при выборе диапазона концентраций для комплексов (№1 и №2), в состав которых входят конъюгаты ГГЧ с содержанием морфина в соотношении 9 : 1 и 17 : 1 моль гаптена на 1 моль

белка, наблюдается сужение диапазона концентраций ( $1-5 \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$ ). Эти факты свидетельствуют о снижении доступности антигенных детерминант для связывания с антителами. Аналогичные исследования выполнены для комплексов №3, №4 и №5, состоящих из конъюгатов ЧСА, содержащих в своем составе 5:1 и 15:1 моль гаптена на 1 моль ЧСА. Для комплекса №3 отмечено сужение интервала концентраций в ИФА по сравнению с иммуногеном №4. Исследованы комплексы, различающиеся соотношением связывания с синтетическим полимером (1:10 для комплекса №4 и 1:4 для комплекса №5). Установлен оптимальный диапазон концентраций в ИФА, составляющий 1–4 и 1–2  $\text{мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$  соответственно. Полученные результаты показывают сужение диапазона концентраций в два раза при более низком связывании с полимером, что свидетельствует об изменении доступности антигенных детерминант.

Иммуногенная активность — это способность продуцировать специфические к опиатам антитела изучена в опытах на животных (крысы) для комплекса конъюгата (М-ГГЧ в соотношении 17:1) с замещением 1:10 полимерной матрицы. Для иммунизации использовались крысы породы Wistar, самцы, в возрасте 6–7 недель. Иммуноген и конъюгат М-ГГЧ, используемый в качестве контроля сравнения, вводили по 4 раза, на 0, 7, 14 и 21 день внутримышечно, в объеме 0.2 мл на 1 крысу. Забор крови проводили непосредственно перед вакцинацией на 0, 7, 14, 21 и 35 дни путем иссечения подъязычной вены в объеме 1–1.5 мл. Титр антиморфиновых антител и их специфичность определяли методом ИФА. Строили кривые титрования для каждой порции сыворотки — зависимость оптической плотности от разведения сыворотки. Титр сыворотки определяли как ее разведение, при котором достигается 50% сигнала ( $\text{ОП}_{\text{max}} - \text{ОП}_{\text{min}}/2$ ).

В результате проведенного эксперимента установлено, что более высокий титр антител обеспечивает иммунизация животных при меньших дозах введения комплекса полимера и конъюгата. Титр антисыворотки на 35-й день составил 1:8400 при дозе М-ГГЧ

$300 \text{ мкг} \cdot \text{кг}^{-1}$ , а при введении  $200 \text{ мкг} \cdot \text{кг}^{-1}$  М-ГГЧ–полимер титр достиг большего значения (1:12 700) уже на 21-й день от начала иммунизации. Конструкция разработанного иммуногена позволяет, во-первых, снизить вводимую дозу, во-вторых, достичь высокого титра антител при уменьшении количества инъекций.

Конкурентным ИФА определена специфичность антител, полученных при иммунизации животных комплексом М-ГГЧ–полимер. Диапазон концентраций ингибитора морфина, героина (соединение, родственное по структуре), а также метадона, фенobarбитала, дельта-9-тетрагидроканнабинола ( $\Delta^9$ -ТГК), амфетамина (вещества, относящиеся к другим классам наркотических препаратов) составлял  $0.1 - 10\,000 \text{ нг} \cdot \text{мл}^{-1}$ . Доказано образование антител, специфичных к морфину и неспецифичных к наркотическим веществам других классов.

Изучена токсичность иммуногена М-ГГЧ–полимер в экспериментах *in vivo* на мышах. Зависимые от дозы иммуногена летальные эффекты представлены в табл. 2, 3.

Показано, что субстанция при остром введении мышам почти не оказывает токсического действия. Величины  $\text{LD}_{50}$  при внутрижелудочном введении у мышей разного пола колеблются от 18 до  $20 \text{ г} \cdot \text{кг}^{-1}$ , при внутрибрюшинном — от 2000 до  $4000 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1}$ . Результаты токсикометрии, данные некропсии и наблюдений за экспериментальными животными в постинтоксикационном периоде острого отравления позволяют

**Таблица 2.** Токсичность иммуногена М-ГГЧ–полимер при внутрибрюшинном введении мышам.

Доза $\text{мг} \cdot \text{кг}^{-1}$	1000	1260	1580	2000	3000	4000
Эффект, пало/ всего (самцы)	0/5	0/5	1/5	2/5	3/5	5/5
Эффект, пало/ всего (самки)	0/5	0/5	1/5	2/5	3/5	5/5

**Таблица 3.** Токсичность иммуногена М-ГГЧ–полимер при внутрижелудочном введении мышам.

Доза, мг/кг	8750	11 060	13 930	17 500	21 455	27 790	35 000
Эффект, пало/ всего (самцы)	0/5	0/5	1/5	2/5	3/5	4/5	5/5
Эффект, пало/ всего (самки)	0/5	0/5	0/5	1/5	3/5	4/5	5/5

отнести субстанцию к IV – V классу малотоксичных – практически нетоксичных лекарственных веществ.

Таким образом, при разработке синтетического иммуногена вакцины для лечения опиоидной наркозависимости, выбраны и оптимизированы основные параметры конструкции иммуногена. Установлены соотношения гаптена – эпитопа выработки специфических антител, макромолекулярного носителя и полимерной матрицы. По результатам ИФА определена доступность и специфичность эпитопов синтетических иммуногенов. Проведено исследование безопасности использования разработанного синтетического иммуногена.

### Литература

1. Е.А.Брюн, М.А.Мягкова, В.С.Морозова. *Вопросы наркологии*, (1), 7–4 (2011)

2. T.R.Kosten, C.B.Domingo. *Expert Opin Biol Ther.*, **13** (8), 1093–1097 (2013)
3. X.Y.Shen, F.M.Orson, T.R.Kosten. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **91** (1), 60–70 (2012)
4. J.E.Schlosburg, L.F.Vendruscolo. *PNAS*, **110** (22), 8751–8752 (2013)
5. E.Laurenzanaa, H.Hendricksond, D.E.Carpenterc. *Vaccine*, **27** (50), 7011–7020 (2009)
6. G.N.Stowe, L.F.Vendruscolo, S.Edwards, J.E.Schlosburg, K.K.Misra, G.Schulteis, A.V.Mayorov, J.SZakhari., G.F.Koob, K.D.Janda. *J. Med. Chem.*, **54** (14), 5195–5204 (2011)
7. B.Anton, A.Salazar, A.Flores, M.Matus, R.Marin, J.A.Hernandez, P.Leff. *Hum. Vaccin.*, **5** (4), 214–229 (2009)
8. T.A.Kosten, X.Y.Shen, P.W.O'Malley, B.M.Kinsey, E.D.Lykissa, F.M.Orson, T.R.Kosten. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, **45**, 223–229 (2013)
9. Q.Q.Li, C.Y.Sun, Y.X.Luo, Y.X.Xue, S.Q.Meng, L.Z.Xu, N.Chen, J.H.Deng, H.F.Zhai, T.R.Kosten, J.Shi, L.Lu, H.Q.Sun. *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, **18**, 5 (2014)
10. М.А.Мягкова, Т.В.Абраменко, О.И.Эпштейн, В.И.Морозова. *Наркология*, (3), 53–55 (2006)

# Иммунохроматографический анализ психоактивных веществ в биологических объектах

М.А.Мягкова,<sup>1</sup> С.Н.Петроченко,<sup>1</sup> Е.А.Орлова<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Лаборатория иммунохимии физиологически активных веществ ИФАВ РАН

<sup>2</sup> Лаборатория иммунохимии МНПЦ наркологии

## 1. Введение

Одной из самых актуальных задач в современном обществе является борьба с распространением наркомании, в том числе совершенствование методик своевременной диагностики наркозависимости и определения наркотиков в различных матрицах. Наиболее удобным и недорогим скрининговым методом определения наркотических веществ является иммунохроматографический анализ (ИХА). Из-за простоты в использовании и возможности применения в «полевых» условиях, без оборудования, метод получил наиболее широкое распространение среди всех скрининговых методов в различных областях: клинической диагностике, самодиагностике, экологическом мониторинге, сельском хозяйстве, ветеринарии, биозащите и др. [1].

Разработка технологических стадий иммунохроматографического анализа является по сути «перенесением» иммунореагентов из формата более известного иммуноферментного анализа (ИФА) на формат ИХА, т.е. на нитроцеллюлозную тест-полоску. Однако данный процесс является многостадийным: подбор материалов, реагентов и условий проведения анализа осуществляется на нескольких этапах разработки ИХА. Перечислим эти основные этапы:

1) выбор материалов для производства тест-полосок;

2) подбор оптимальных концентраций иммунореагентов: конъюгатов антитела – метка, конъюгатов антиген – белок – носитель, антивидовых антител;

3) подбор дополнительных реагентов для предобработки компонентов тест-полоски (позволяет улучшить свойства потока, и тем самым обеспечить лучшую чувствительность теста);

4) подбор реагентов и их концентраций для «забивки» мембраны (позволяет улучшить характеристики анализа и стабильность теста) [1, 2].

На рис. 1 представлена схема производства иммунохроматографических тестов. На каждом этапе данной технологической схемы производится оптимизация условий.

Для эффективного выявления потребителей наркотиков необходим скрининг наркотических веществ в разных видах объектов: биологических и небиологических. При установлении факта приема ПАВ конкретным человеком и диагностики наркозависимости определяют ПАВ и их метаболиты в моче [3–6], слюне [3, 7, 8], крови, волосах [3, 9], смывах с кожи (потожировые выделения), экстрактах тканей. Все данные виды биообъектов не являются взаимозаменяемыми, так как каждый из них показывает разные сроки употребления ПАВ и используется, соответственно, для различных целей [10]. В работе полиции, связанной с борьбой с наркотиками, часто необходимо определять наличие наркотических веществ в неизвестных субстанциях, подозрительных частях растений, на поверхностях. Путем выявления ПАВ в смывах, сделанных на рабочем месте человека (с рабочего стола, кла-

---

**М.А.Мягкова.** Доктор биологических наук, профессор, заведующая лабораторией иммунохимии физиологически активных веществ ИФАВ РАН.

e-mail: m.a.myagkova@gmail.com

**С.Н.Петроченко.** Кандидат биологических наук, старший научный сотрудник той же лаборатории.

e-mail: dianark777@mail.ru

**Е.А.Орлова.** Научный сотрудник лаборатории иммунохимии МНПЦ наркологии.

e-mail: dianark@mail.ru

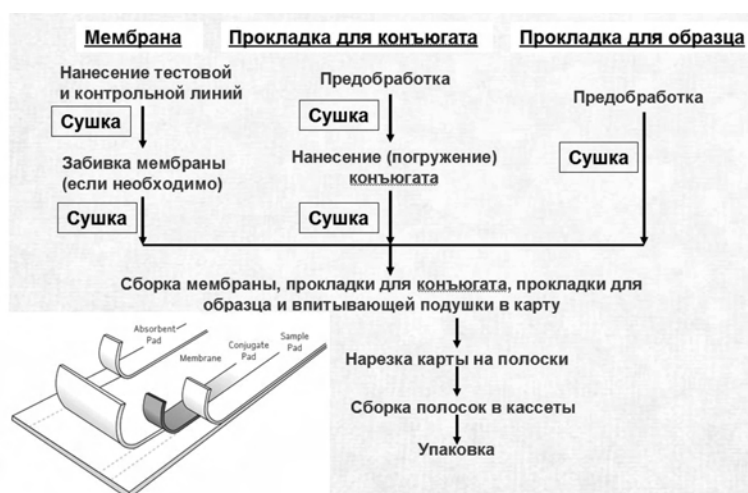


Рис. 1. Схема стадий производства иммунохроматографических тестов.

виатуры и др. предметов, с которыми часто соприкасается человек), можно определить наркопотребителя без согласия на тестирование и даже без ведома подозреваемого. Это особенно важно для предотвращения употребления наркотиков работниками, занятыми в опасных и особенно ответственных сферах, на работах, связанных с риском техногенных катастроф и опасностью для населения.

Иммунохроматографические тесты для определения наркотических и психоактивных веществ в моче широко распространены на рынке медицинских изделий. Это наиболее простой метод определения недавнего факта употребления ПАВ. Ранее нами разработан метод ИХА определения ПАВ в слюне [11], предназначенный для выявления состояния наркотического опьянения. Определение ПАВ в более сложных объектах, требующих пробоподготовки (волосы, ногти, небологические объекты) производится только хроматомасс-спектрометрическими методами в химико-токсикологических и экспертно-криминалистических лабораториях [9, 12]. Задача настоящей работы — разработка тест-систем ИХА и методик пробоподготовки для быстрого скрининга ПАВ в различных

видах биологических и небологических объектов: потожировых выделениях, волосах, смывах с поверхностей, частях растений, неизвестных субстанциях.

## 2. Результаты и обсуждение

При разработке иммунохроматографических тест-систем для выявления низкомолекулярных веществ чаще всего используют непрямую конкурентную схему ИХА (рис. 2). В соответствии с этим форматом были разработаны тест-полоски в настоящей работе: образец, предположительно содержащий ПАВ (Аг), наносится в нижнюю часть полоски (мембрана для образца) капельным способом, либо путем погружения. Если в образце нет ПАВ,

жидкость с помощью капиллярных сил поднимается вверх, проходит прокладку с нанесенным красящим конъюгатом Ат-Ау, смывает конъюгат, который потом связывается на тестовой линии с конъюгатом Аг-Ова, в результате чего тестовая линия окрашивается. При наличии ПАВ в образце в прокладке для конъюгата происходит связывание ПАВ с Ат-Ау. И далее, при прохождении через тестовую линию, не происходит связывания Ат-Ау с Аг-Ова, — тестовая линия не окрашивается. На полоске присутствует также контрольная линия с нанесенными антивидовыми Ат, которые связывают несвязавшиеся Ат-Ау, а также комплексы Ат-Ау – Аг.

На первой стадии разработки тест-полосок проводили предварительный подбор концентраций иммунореагентов в формате ИФА, используют параметры созданных нами ранее тест-систем ИФА [4, 7, 10]. Затем на нитроцеллю-

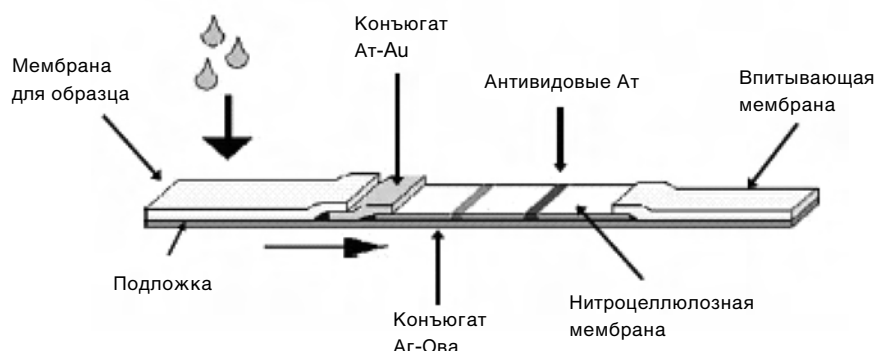


Рис. 2. Устройство разработанных тест-полосок.



**Таблица 1.** Специфичность иммунохроматографических тест-полосок.

Соединение	ПО, нг · мл <sup>-1</sup>	Соединение	ПО, нг · мл <sup>-1</sup>
<i>Полоска «Бензодиазепины»</i>		<i>Полоска «Морфин»</i>	
альпразолам	195	морфин	200
бромазепам	390	кодеин	300
клобазам	390	героин	300
диазепам	200	этилморфин	6250
эстазолам	780	гидрокодон	50 000
флунизепам	> 10 000	6-моноацетилморфин	400
лоразепам	> 10 000	морфин 3-β-D-глюкоронид	1000
нитразепам	100	оксикодон	> 10 000
норхлордиазепоксид	3125	<i>Полоска «Амфетамин»</i>	
оксазепам	200	D-амфетамин	300
триазолам	> 10 000	D,L-амфетамин	390
<i>Полоска «Экстази»</i>		L-амфетамин	> 10 000
3,4-метилendioксимет-амфетамин (МДМА)	500	3,4-Метилendioксиамфетамин	1560
3,4-метилendioксиамфетамин	3000	<i>Полоска «Каннабиноиды»</i>	
3,4-метилendioксиэтиламфетамин	300	11-нор-Δ9-ТГК-9 СООН	50
D-амфетамин	5000	каннабинол	> 20 000
<i>Полоска «Метадон»</i>		11-нор-Δ8-ТГК-9 СООН	30
метадон	300	Δ8-ТГК	150
доксиламин	> 10000	Δ9- ТГК	150
6-моноацетилморфин (6-МAM)	800		
морфин 3-β-D-глюкоронид	2650		

лозной мембране оптимизировали эти концентрации. Оптимальные концентрации конъюгатов Ag-Ова составили: 1 мкг · мл<sup>-1</sup> для Мор-ОВА, 2 мкг · мл<sup>-1</sup> для Амф-ОВА, 0,25 мкг · мл<sup>-1</sup> для Кан-ОВА и 1 мкг · мл<sup>-1</sup> для МДМА-ОВА, 1,5 мкг · мл<sup>-1</sup> для Бзд-ОВА, 1 мкг · мл<sup>-1</sup> для Мтд-ОВА. Подобраны оптимальные титры Ат-Au, которые составили значения от 1 : 3000 до 1 : 20 000. Антивидовые Ат наносились на полоски в разведении 1 : 2000.

Для разработанных иммунохроматографических тест-систем проведено исследование основных аналитических характеристик — чувствительности и специфичности определения наркотических и психотропных соединений. Пределы обнаружения ПАВ, т.е. минимально определяемая концентрация, определенные путем тестирования растворов ПАВ в ФБС, составили: 200 нг · мл<sup>-1</sup> для морфина, 300 нг · мл<sup>-1</sup> для амфетамина, 50 нг · мл<sup>-1</sup> для каннабиноидов, 300 нг · мл<sup>-1</sup> для метадона, 500 нг · мл<sup>-1</sup> для экстази и 200 нг · мл<sup>-1</sup> для диазепама.

Специфичность разработанных тест-полосок определяли путем нанесения растворов близко-

родственных соединений в разных концентрациях в ФБС. В табл. 1 приведены минимальные концентрации веществ, при которых тест-полоска показывает положительный результат.

Разработанные тест-системы показали высокую специфичность к определяемым веществам, а также веществам того же класса. Так, тест-полоска «морфин» может использоваться для определения как самого морфина, так и других опиатов (героина, кодеина, 6-моноацетилморфина, метаболита морфин 3-β-D-глюкоронида), более далекие по структуре вещества при этом не определяются, т.е. перекрестной реакции с соединениями веществами других классов не обнаружено. Аналогичный результат получен и для других тест-полосок.

Процедуры пробоподготовки биологических и небиологических объектов разрабатывались таким образом, чтобы разработанный набор можно было использовать в «полевых» условиях, без специального лабораторного оборудования. В работе производился подбор массы (объема) образцов и объемов растворителя и ФБС с целью получения максимального извлечения ПАВ из образца и его успешного опреде-



**Рис. 3.** Схема проведения пробоподготовки и ИХА ПАВ в различных объектах.

ления с помощью тест-полосок. В результате, разработаны следующие методики пробоподготовки (рис. 3).

На первом этапе происходит измельчение объекта, если это требуется (для волос, частей растений, твердых объектов). Твердый объект «натирают» абразивной бумагой до состояния порошка. Далее измельченный объект или порошок в количестве 200 мг помещают во флакон с 5 мл этанола, встряхивают несколько раз и оста-

вляют на ночь до полной экстракции. Затем еще раз встряхивают.

При исследовании следов наркотических веществ на поверхностях приготавливают смыв с поверхности: палочку с ватным тампоном смачивают во флаконе с 5 мл этанола, хорошо протирают поверхность (объект) несколько раз, помещают тампон во флакон с растворителем, хорошо перемешивают, повторяют процедуру несколько раз. Затем выливают полученный раствор в чашку Петри и оставляют в вытяжном шкафу до полного высыхания (2–3 часа) или высушивают в потоке воздуха. Далее в чашку Петри добавляют 0.5 мл ФБС, встряхивают, и полученный экстракт используют для проведения ИХА. Неизвестные жидкости (5–10 капель) смешивают непосредственно с 0.5 мл ФБС и полученный раствор используют при проведении анализа.

Для определения характеристик разработанных методик для анализа реальных объектов используют два подхода: анализ большого числа образцов, либо, если это невозможно, изготовление «спайковых» образцов, т.е. искусственное введение различных концентраций вещества в объект и последующим анализом. В обоих случаях проводят параллельное исследование образцов подтверждающим методом (в нашем случае — ВЭЖХ). Моча, волосы, смывы с кожи были собраны у наркозависимых, проходящих лечение в МНПЦ наркологии. Вычисляли ста-

**Таблица 2.** Статистические характеристики ИХА ПАВ в моче, экстрактах волос, смывах с кожи.

Класс ПАВ	опиаты			амфетамины			каннабиноиды		
	моча	волосы	кожа	моча	волосы	кожа	моча	волосы	кожа
Количество употребляющих ПАВ	20			18			12		
Чувствительность, %	100	100	98	100	100	100	1100	97	97
Специфичность, %	100	100	100	100	100	100	1100	100	100
Класс ПАВ	экстази			метадон			бензодиазепины		
	моча	волосы	кожа	моча	волосы	кожа	моча	волосы	кожа
Количество употребляющих ПАВ	9			9			8		
Чувствительность, %	100	95	95	100	95	95	1100	100	94
Специфичность, %	100	100	100	100	100	100	1100	100	100

**Таблица 3.** Анализ спайковых образцов табака и смывов с поверхности.

Образцы табака			Смыв с поверхности стола		
$C_v^1$	$C_n^1$		$C_v^2$	$C_n^2$	
	ИХА, $n=3$	ВЭЖХ		ИХА, $n=3$	ВЭЖХ
<i>Δ9-тетрагидроканнабинол</i>					
1	+/-	0.51	50	+/-	28
5	+	2.9	200	+	94
20	+	14	1000	+	447
<i>морфин</i>					
			50	+	24
			200	+	116
			1000	+	463
<i>амфетамин</i>					
			75	+	36
			300	+	182
			1000	+	605

**Примечание.**  $C_v^1$  — введенная концентрация ( $\text{мг} \cdot \text{г}^{-1}$ ),  $C_n^1$  — найденная концентрация ( $\text{мг} \cdot \text{г}^{-1}$ ),  $C_v^2$  — введенная концентрация ( $\text{нг} \cdot 100 \text{ см}^{-1}$ ),  $C_n^2$  — найденная концентрация ( $\text{нг} \cdot 100 \text{ см}^{-1}$ ).

тистическую чувствительность и специфичность методик (табл. 2). Указанные характеристики составили значения от 94 до 100%, что доказывает высокую достоверность определения ПАВ в данных биообъектах.

Апробацию методик для выявления ПАВ в частях растений и смывах с поверхностей проводили с помощью тест «введено-найденно» (табл. 3).

Сравнение введенной и найденной концентрации показывает, что процент извлечения

ПАВ из растений составляет 51–70%, в смывах с поверхностей — 44–60%. Данные значения приемлемы для целей предварительного скрининга ПАВ в полевых условиях и обусловлены тем, что создаваемые методики пробоподготовки были не на количественное извлечение, а на быстрый скрининг без применения специального оборудования.

В процессе апробации методик и тест-систем в реальных объектах были оценены пределы обнаружения ПАВ в моче, волосах, смывах с поверхностей, таблетках, твердых субстанциях, порошках, частях растений и жидкостях (табл. 4).

Разработаны простые методики пробоподготовки для быстрого определения психоактивных веществ шести классов: опиаты, амфетамины, каннабиноиды, экстази, бензодиазепины, метадон в моче, потожировых выделениях, волосах, смывах с поверхностей, частях растений, неизвестных субстанциях. Пределы обнаружения ПАВ в моче составили:  $200 \text{ нг} \cdot \text{мл}^{-1}$  для опиатов,  $300 \text{ нг} \cdot \text{мл}^{-1}$  для амфетаминов,  $50 \text{ нг} \cdot \text{мл}^{-1}$  для каннабиноидов,  $500 \text{ нг} \cdot \text{мл}^{-1}$  для экстази,  $200 \text{ нг} \cdot \text{мл}^{-1}$  для бензодиазепинов,  $300 \text{ нг} \cdot \text{мл}^{-1}$  для метадона. Представленные методы пробоподготовки и анализа не требуют специального оборудования и реагентов и могут быть использованы в «полевых» или домашних условиях неспециалистами для предварительного скрининга ПАВ. Разработанные тест-системы имеют широкие перспективы применения: для диагностики наркомании, выявления наркопотребления в школах, вузах, на предприятиях, среди работников опасных производств, силовых структур, в работе полиции.

**Таблица 4.** Минимально определяемые концентрации ПАВ в различных объектах.

Класс ПАВ	ПО в моче, $\text{нг} \cdot \text{мл}^{-1}$	ПО в смывах с поверхностей, $\text{нг} \cdot 100 \text{ см}^{-2}$	ПО в волосах, $\text{мкг} \cdot \text{г}^{-1}$	ПО в частях растений, $\text{мг} \cdot \text{г}^{-1}$	ПО в твердых объектах, $\text{мкг} \cdot \text{г}^{-1}$	ПО в жидкостях, $\text{мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$
Опиаты	200	100	4.2	—	0.5	0.8
Амфетамин	300	150	6.1	—	0.75	1.2
Каннабиноиды	50	50	1.6	2	0.125	0.2
Бензодиазепины	300	—	6.5	—	0.75	1.2
Экстази	500	—	12	—	1.25	2
Метадон	200	—	4.4	—	0.5	0.8

## Литература

1. J.He, S.Parker. In *The Immunoassay Handbook Theory and Applications of Ligand Binding*. ELISA and Related Techniques. 2013, P. 139–147
2. *Lateral Flow Immunoassay*. (Eds R.C.Wong, H.Y.Tse). Springer, USA, 2009
3. Н.С.Горбачева, В.С.Морозова, М.А.Мягкова. *Вопросы наркологии*, (5), 94–99 (2013)
4. Ш.А.Демерчян, С.Н.Петроченко, А.В.Смирнов, Т.В.Абраменко, М.А.Мягкова. *Клиническая лабораторная диагностика*, (12), 20–33 (2007)
5. M.Otero-Fernández, J.A.Cocho, M.J.Tabernero, A.M.Vermejo, P.Vermejo-Barrera, A.Moreda-Picéiro. *Analytica Chimica Acta*, **784** (19), 25–32 (2013)
6. Н.М.Солодухина, Т.В.Абраменко, В.В.Пушкина, В.С.Морозова, М.А.Мягкова, И.А.Грицкова. *Микроэлементы в медицине*, **11** (3–4), 71–74 (2010)
7. Р.Ю.Киселева, М.А.Мягкова, И.В.Шакир, Е.А.Брюн, В.С.Морозова. *Биотехнология*, **4**, 89–93 (2010)
8. Р.Ю.Киселева, М.А.Мягкова, Л.А.Анохин, С.Н.Петроченко, А.В.Смирнов, В.С.Морозова, Е.А.Брюн. *Судебно-медицинская экспертиза*. (2), 42–44 (2010)
9. L.Imbert, S.Dulaurent, M.Mercerolle, J.Morichon, G.Lachatre, J.-M.Gaulier. *Forensic Science International*, **234**, 132–138 (2014)
10. Е.А.Брюн, М.А.Мягкова, Е.И.Сокольчик, В.С.Морозова, С.Н.Петроченко, Р.Ю.Киселёва. *Методические рекомендации №13. Комплексная методика диагностического тестирования для выявления потребителей наркотических веществ*. Утв. Деп. здравоохранения Правительства Москвы 27.08.2011, Москва, 2011, 32 с.
11. М.А.Мягкова, В.С.Морозова. *Способ определения наркотических средств в ротовой жидкости человека методом иммунохроматографии*. Патент РФ 2442988 (год????)
12. Е.А.Брюн, М.А.Мягкова, В.С.Морозова, С.В.Морозов. *Вопросы наркологии*, **1**, 7–14 (2011)
13. М.А.Мягкова, М.В.Лушникова, О.Ю.Полевая. *Вопросы наркологии*, (4), 7–11 (1989)
14. G.T.Hermanson. *Bioconjugate Techniques*. Academic Press, 2008. P. 924–934
15. И.А.Любавина, А.А.Зинченко, М.И.Лапенков, Т.Л.Николаева. *Биоорганическая химия*, **31** (1), 108–112 (2005)
16. Приказ Минздравсоцразвития РФ от 27 января 2006 г. № 40 «Об организации проведения химико-токсикологических исследований при аналитической диагностике наличия в организме человека алкоголя, наркотических средств, психотропных и других токсических веществ»

# Организация проведения доклинических испытаний химических веществ с фармакологической активностью в ЦДИ ИФАВ РАН

А.С.Кинзирский,<sup>1</sup> В.О.Небогатиков<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Лаборатория фармакологии ИФАВ РАН

<sup>2</sup> Центр доклинических исследований ИФАВ РАН

С апреля 2016 г. в России приказом № 199н Министерства здравоохранения РФ утверждены Правила надлежащей лабораторной практики, предусматривающие приведение всех доклинических, вне клинических и экспертных исследований в соответствие с международными стандартами GLP. Это в свою очередь предполагает унификацию дизайна экспериментов, гармонизацию получаемых результатов и их интерпретацию в рамках требований и стандартов FELASA, OECD, FDA, и др.

Принципы надлежащей лабораторной практики применимы для любых испытаний в области медицинской и экологической безопасности химических соединений, проводимых в целях регистрации и лицензирования данных соединений.

В связи с введением в России стандартов надлежащей лабораторной практики по принципам ОЭСР (Организация экономического сотрудничества и развития) на базе ИФАВ РАН в 2014 году основан Центр доклинических исследований. Центр также выполняет функции центра коллективного пользования научным оборудованием для обеспечения исследований трансгенными животными.

Основными направлениями деятельности ЦДИ ИФАВ РАН являются:

1. Проведение на имеющемся оборудовании в соответствии с принципами GLP доклиниче-

ских испытаний по безопасности лекарственных средств, пестицидов, косметической продукции, ветеринарных препаратов, пищевых и кормовых добавок, а также химических веществ промышленного назначения. Оказание услуг исследователям и научным коллективам базовой организации и иным заинтересованным пользователям;

2. Обеспечение исследований специфической фармакологической активности и фармакодинамических свойств соединений на оригинальных трансгенных моделях нейродегенеративных заболеваний человека с целью разработки новых потенциальных лекарственных средств генномодифицированными линиями животных с различными видами внутринейрональных протеинопатий.

ЦДИ ИФАВ РАН располагается в корпусе №2 Института физиологически активных веществ РАН. В 2010 г. произведена реконструкция помещений в соответствии с международными стандартами GLP за счет средств МНТЦ и средств РАН.

В виварии ЦДИ ИФАВ РАН, расположенном на 2 этаже здания, для обеспечения стерильности в условиях содержания животных были реализованы оригинальные технологические решения:

— виварий построен по принципу двухкоридорной системы, который позволяет разделить «чистые» и «грязные» помещения и перемещения материалов и животных. Перемещение персонала, животных инструментов и т.д. беспрепятственно возможно только в одном направлении;

— помещения вивария изолированы друг от друга не только за счет конструктивных перегородок и дверей, но и с помощью системы приточно-вытяжной вентиляции, создающей

---

**А.С.Кинзирский.** Доктор медицинских наук, заслуженный деятель науки, главный научный сотрудник, заведующий лабораторией фармакологии ИФАВ РАН, научный руководитель ЦДИ ИФАВ РАН.

e-mail: alex.kinzirsky@ipac.ac.ru

**В.О.Небогатиков.** Кандидат биологических наук, научный сотрудник Центра доклинических исследований ИФАВ РАН. e-mail: vnebohatikov@gmail.com

разность давлений между комнатами содержания и коридорами, «чистой» и «грязной» зонами;

— прежде чем попасть в «чистую» зону, все новые объекты: оборудование, корм, подстил, клетки, проходят автоклавирование, либо стерилизацию в дезинфекционной камере;

— в виварии реализована система обеспечения условий содержания животных SPF-статуса (животные без специфических патогенных организмов). Асептические условия для содержания таких животных поддерживаются за счет использования индивидуально вентилируемых клеток (ИВК) в обособленных вентилируемых стеллажах. Для манипуляций с SPF-животными выделены специальные комнаты, оснащенные ламинарными боксами;

— в отделке и строительстве помещений использованы материалы, не накапливающие загрязнений, гигиеничных, легко обрабатываемых;

— в центре организован контролируемый постоянный мониторинг состояния здоровья животных;

— доступ посторонних лиц в помещения вивария ограничен;

— в технические помещения вивария организован отдельный вход с улицы.

Системы приточно-вытяжной вентиляции и кондиционирования обеспечивают стабильный микроклимат в помещениях содержания животных круглые сутки и круглый год, поддерживая постоянную температуру в пределах 18–25°C; относительную влажность воздуха 30–70%, показатели температуры и влажности сохраняются, мониторинг осуществляется непрерывно. Комнаты содержания животных оснащены автоматической системой «день–ночь», обеспечивающей 12-часовой период освещения.

### 1. Содержание животных

ЦДИ ИФАВ РАН использует два типа клеток для содержания животных: ИВК (индивидуально вентилируемые клетки) — для SPF-животных и невентилируемые клетки для животных в конвенциональной зоне.

Используемые клетки одинаково удовлетворяют как потребностям животных, так и требованиям гигиены и санитарии.

ИВК со встроенными фильтрами сводят до минимума распространение возбудителей ин-

фекционных заболеваний воздушным путем между клетками или группами клеток.

Для содержания и манипуляций с SPF-животными (свободными от патогенной микрофлоры) выделено девять помещений в барьерной зоне, ограниченной от конвенциональной зоны дополнительным воздушным шлюзом. Помещения полностью оснащены оборудованием для стерильного содержания и манипуляций с животными. Максимально возможное количество одновременно содержащихся животных составляет 10 000–15 000 мышей или 6000 крыс.

Животные для краткосрочных исследований содержатся в специально отведенных комнатах конвенциональной зоны. Животные разных видов содержатся в разных комнатах. Основной принцип размещения животных — отдельное исследование — отдельная комната.

Конвенциональные животные содержатся в 15-ти комнатах второго этажа. Максимально возможное количество одновременно содержащихся животных составляет 20 000 мышей или 8000 крыс.

Организация содержания экспериментальных животных обеспечивает благополучие животных, высокое качество научных результатов и испытаний, в которых используются животные, а также обеспечивает их здоровье и безопасность персонала.

### 2. Лабораторные помещения

На 1 этаже размещаются специализированные лаборатории и вспомогательные службы. Здесь проводятся исследовательские работы с органами и тканями экспериментальных животных в рамках доклинической оценки безопасности новых потенциальных лекарственных средств, процедуры эвтаназии и некропсии выведенных из эксперимента животных.

### 3. Персонал

Исследовательский персонал ЦДИ ИФАВ РАН имеет соответствующую квалификацию и обладает достаточным практическим опытом работы.

Ежегодно руководители исследований ЦДИ и персонал службы обеспечения качества проходят курсы повышения квалификации. Весь персонал ЦДИ проходит внутреннее обучение введенным в использование стандартным опера-

ционными процедурам. На рис. 1 представлена структурная схема ЦДИ, в которой отображены исследовательские группы центра.

#### 4. Исследовательское оборудование

Центр оснащен необходимым оборудованием для изучения физиологических, гематологических, гистологических, клинико-патологических показателей тест-систем в ходе токсикологических исследований.

Кроме того в центре имеется уникальное оборудование. Например, установка «CatWalk XT» фирмы Noldus для исследования поведенческих реакций мелких грызунов.

Комплексная система для гистологических исследований Leica позволяет проводить гистохимические и иммуноморфологические исследования любой сложности. Применение конфокального микроскопа LSM 880 (Carl Zeiss) с модулем Airyscan позволяет исследовать тонкую структуру объекта в трехмерном пространстве. С помощью программного обеспечения микроскопа на основе серии изображений создается объемное изображение объекта, что позволяет рассмотреть его под разными углами для получения большей информации о взаиморасположении и форме его элементов, например, дать ценную информацию о форме клеток, цито-

скелете, структуре ядра, хромосом, или даже о локализации в них отдельных генов.

Все имеющиеся оборудование, используемое для получения, хранения и поиска данных, а также для контроля параметров окружающей среды полностью соответствует целям и задачам проводимых исследований.

В Центре проводится регулярное техническое обслуживание оборудования, используемого в исследованиях, включая профилактический осмотр, уход, проверку в соответствии со стандартными операционными процедурами. Калибровка средств измерения проводится в соответствии с национальными или международными стандартами измерения.

#### 5. Система обеспечения качества

Испытательный центр имеет документированную программу обеспечения качества, разработанную специалистами Службы обеспечения качества (СОК), для обеспечения всех проводимых в нем исследований статуса GLP.

В ЦДИ ИФАВ РАН разработаны и утверждены руководством 150 стандартных операционных процедур (СОП), которые предназначены для унификации выполняемых процедур, обеспечения качества и полноты сбора данных.



Рис. 1. Структурно-функциональная организация Центра доклинических исследований ИФАВ РАН.

Персонал по обеспечению качества проверяет и согласовывает планы исследований, осуществляет систематический контроль над проведением исследований в соответствии с настоящими принципами надлежащей лабораторной практики, а также контролирует заключительные отчеты; для подтверждения того, что методы, процедуры и результаты исследований изложены точно и полностью, и в полной мере отражают первичные данные.

Исследования по оценке безопасности потенциальных лекарственных средств проводятся в соответствии с отечественными требованиями, изложенными в «Руководстве по проведению доклинических исследований лекарственных средств» (Миронов А.Н., Бунатян Н.Д. и др.) 2012 г, соответствующих ГОСТах (ГОСТ 32296-2013; ГОСТ 32519-2013; ГОСТ 32637-2014 и т.д.). Данные российские ГОСТы являются адаптацией Руководств по использованию тестов ОЭСР (OECD Test guideline), которые широко используется мировым научным сообществом.

## 6. Достижения

В декабре 2013 г. ЦДИ ИФАВ РАН сертифицирован как аккредитованный ЦКП ООО «Технопарк «Сколково», а в 2017 года Федеральной службой по аккредитации (Приказ № НЛБ-7 от 02 июня 2017 г., Сертификат №10) присвоен статус соответствия принципам надлежащей лабораторной практики, в области неклинических (доклинических) исследований, проводимых в испытательном Центре. Центр также входит в научно-техническую инфраструктуру Российской Федерации и зарегистрирован на Портале «Современная исследовательская инфраструктура Российской Федерации» под номером 311949.

## 7. Выполненные работы и основные партнеры

Начиная с 2013 г. в Центре проведены исследования в рамках Государственных контрактов и заказов отечественных и зарубежных компаний:

### 7.1. «Развитие инфраструктуры наноиндустрии в Российской Федерации на 2008–2012 годы»

7.1.1. Государственный контракт № 01.648.11.3006 «Разработка методологии и создание средств контроля локализации наночастиц в органах и тканях».

7.1.2. Государственный контракт № 16.648.11.3006 «Разработка методологии оценки безопасности новых видов наноматериалов на основании динамики их элиминации из органов и тканей после длительного воздействия».

### 7.2. «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года»

7.2.1. Государственный контракт № 16.N08.12.1022 «Доклинические исследования лекарственного средства для лечения болезни Альцгеймера на основе диазобициклононана».

7.2.2. Государственный контракт № 2013-2.5-14-N08-0029 «Доклинические исследования противоопухолевого лекарственного средства из группы изохинолонов, ингибитора фосфатазы 1, избирательно разрушающего сосуда в опухолях».

7.2.3. Государственный контракт № 14.N08.12.1027 «Доклинические исследования инновационного лекарственной формы для лечения мягких когнитивных нарушений (МСИ) на основе фторзамещенного пиридо[4,3-b]индола».

7.2.4. Государственный контракт № 14.N08.11.0138 «Доклинические исследования лекарственного средства для лечения болезни Альцгеймера на основе конъюгата карбазола и адамантана».

### 7.3. Представительство АО «Санофи-авентис групп» (Франция)

Экспериментальное доклиническое сравнительное изучение острой, подострой токсичности и местно-раздражающего действия — 4 препарата.

### 7.4. Отечественные заказчики

7.4.1. ФГУП «Гос-ЗМП».


Изучение фармакологической безопасности и хронической токсичности — 1 препарат.

7.4.2. Общество с ограниченной ответственностью «Сорбент-Технологии».

Оценка острой токсичности на двух видах животных (SPF-мыши аутбредные CD1 и SPF-крысы аутбредные SD), при двух способах введения — 3 препарата.







Работы в области  
синтетической  
органической химии



# Фосфорилсодержащие поданды. Синтез, свойства и перспективы практического применения

**В.Е.Баулин**

*Лаборатория фосфорорганических соединений ИФАВ РАН*

Развитие элементоорганической химии в течение многих лет связано с поиском соединений, способных образовывать устойчивые комплексы с ионами металлов. Известно, что фосфорильная группа легко поляризуется и обладает высокой координирующей способностью, поэтому фосфорилсодержащие соединения традиционно рассматриваются как весьма перспективный класс веществ, для целенаправленного поиска эффективных и селективных органических комплексообразующих соединений, которые с середины прошлого века находят практическое применение для концентрирования, выделения и очистки многих промышленно значимых элементов. Однако и в настоящее время, создание комплексообразующих соединений с заданными свойствами является актуальной, достаточно сложной и до конца не решенной проблемой.

Исследования фундаментальных проблем взаимосвязи между строением фосфоорганических соединений и их комплексообразующей способностью начались в ИФАВ РАН 1980 году в Лаборатории элементоорганических соединений под руководством профессора Е.Н.Цветкова. Первоначально объектами исследования был широкий ряд новых фосфорорганических соединений — диоксидов дифосфинов, карбамоилфосфиноксидов и фосфорилподандов различного строения, однако результаты исследования комплексообразующей способности, физико-химических и физиологических свойств этих соединений показали, что наибольший научно-практи-

ческий интерес представляют синтетически доступные ациклические аналоги краун-эфиров (поданды) с фосфорилсодержащими концевыми группами. В структуры фосфорилподандов (ФП) входят как фрагменты полиэфиров — хорошо известных комплексообразующих соединений для связывания щелочных и щелочноземельных металлов (краун-эфиры, глиммы и полиэтиленгликоли), так и фрагменты эффективных экстрагентов лантанидов и актинидов (трибутилфосфат, триоктилфосфиноксид и др.), поэтому ФП рассматриваются как весьма перспективный класс органических комплексообразующих соединений для связывания широкого круга s-, d- и f-элементов. Исследования проблем синтеза, физико-химических свойств и практического применения ФП были продолжены в Группе химии комплексообразователей ИФАВ РАН, и в настоящее время интенсивно проводятся в Лаборатории фосфорорганических соединений ИФАВ РАН.

Основной фундаментальной задачей проводимых исследований является разработка научных основ получения ФП различной дентатности нейтрального и кислотного типа, в установлении корреляций между строением фосфорилподандов и их комплексообразующей и экстракционной способностью по отношению к s-, d- и f-элементам. Не менее важной задачей является и практическая реализация полученных фундаментальных результатов при создании технологий получения и практического применения ион-селективных материалов — мембран ион-селективных электродов, жидкостных экстракционных систем, экстракционно-хроматографических сорбционных материалов (сорбентов) для селективного извлечения промышленно значимых элементов и радиофармацевтических препара-

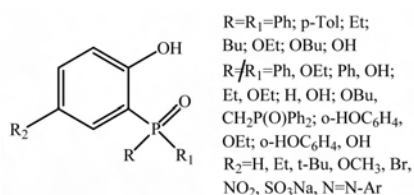


Рис. 1. Структуры синтезированных *орто*-фосфорилфенолов.

ратов диагностического и терапевтического назначения.

На первом этапе работы были разработаны синтетически доступные методы получения и функционализации *орто*-фосфорилированных фенолов — исходных соединений для получения ФП (рис. 1). Конформационно жесткие структуры *орто*-фосфорилфенолов, с одной стороны, придают ФП определенную степень предорганизации, с другой — увеличивают его комплексообразующую способность за счет фосфорильной группы, которая является весьма сильным координирующим фрагментом. Варьирование заместителей при фосфорильной группе *орто*-фосфорилированных фенолов является весьма эффективным подходом к изменению ее координирующих свойств, что вместе с введением алкильных и хромофорных заместителей в фенольное кольцо открывает дополнительные возможности для направленной модификации комплексообразующих и физико-химических свойств фосфорилподандов. Более того, *орто*-фосфорилфенолы являются фосфорильными аналогами салициловой кислоты и, следовательно, представляют интерес в качестве комплексообразующих соединений хелатного типа и физиологически активных веществ.

Для получения *орто*-фосфорилфенолов, производных окисей фосфинов **3a–d** использовалась

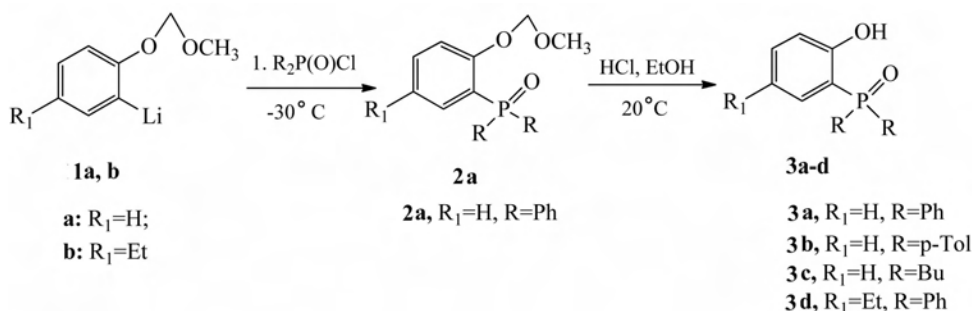


Рис. 2. Схема синтеза *орто*-фосфорилфенолов **3a–d** «сквозным» методом.

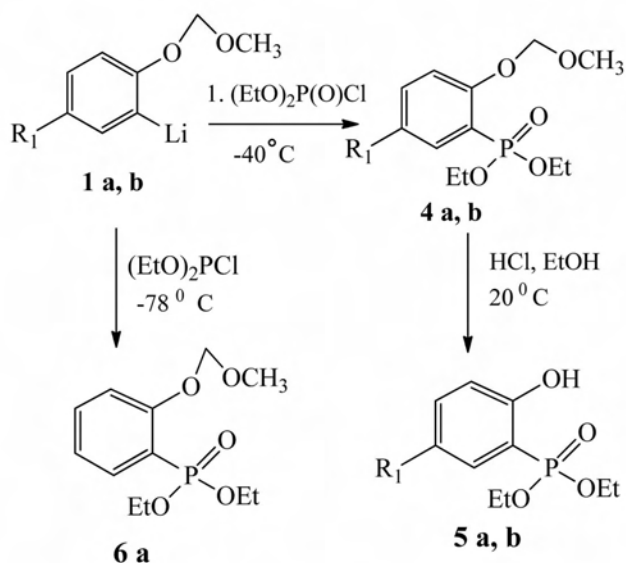


Рис. 3. Схема синтеза *орто*-фосфорилфенолов — производных 2-оксифенилфосфиновых и 2-оксифенилфосфонистых кислот.

реакция метоксиметоксифениллитиевых соединений **1a–b** с хлорангидридами диалкил- и диарилфосфиновых кислот с последующим кислотным гидролизом метоксиметильной группы. Промежуточные метоксиметилвые эфиры *орто*-фосфорилфенолов, за исключением соединения **2a**, не выделялись — процесс вели по так называемому «сквозному» методу (рис. 2) [1].

Аналогичным взаимодействием соединений **1a,b** с диэтилхлорфосфатом при температуре  $-78^\circ\text{C}$  получены *орто*-фосфорилфенолы фосфонатного типа **5a,b** (рис. 3) [2].

Для получения соединений **3a–d** и **5a,b** использовался и альтернативный подход — 1,3-фосфат-фосфонатная перегруппировка арилфосфатов в арилфосфонаты (рис. 4) [3].

Изучено взаимодействие реагента **1a** и с более реакционноспособными диэтилхлорфос-

фитом. Показано, что для получения препаративных выходов соединений **6a** необходимо строго соблюдать соотношение реагентов (1 : 1), температурный режим  $-78^\circ\text{C} \pm 5^\circ\text{C}$  и как можно медленней проводить смешение реагентов (см. рис. 3).

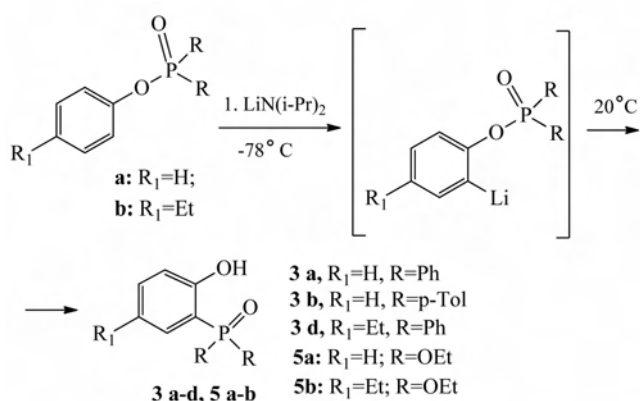


Рис. 4. Схема синтеза *ortho*-фосфорилфенолов фосфат-фосфонатной перегруппировкой.

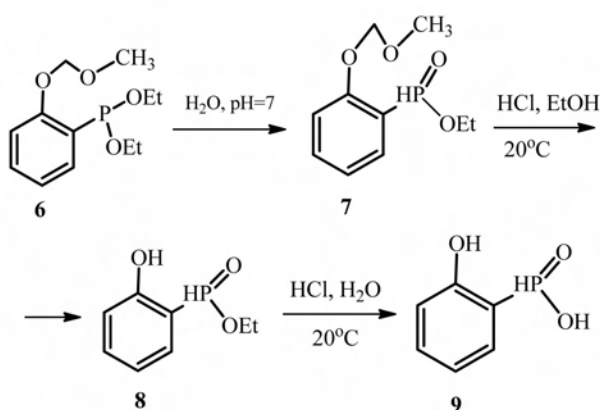


Рис. 5. Схема синтеза 2-оксифенилфосфонистой кислоты **9**.

[4]. Исходя из метоксиметилового эфира **6** разработана схема получения 2-оксифенилфосфонистой кислоты **9**, — фосфорильного аналога салициловой кислоты. Соединение **6** гидролизуется в нейтральной водной среде в кислый эфир фосфонистой кислоты **7**, который после его обработки раствором HCl в абсолютном этаноле дает фосфорилированный фенол **8**. Дальнейший гидролиз смесью конц. HCl и эта-

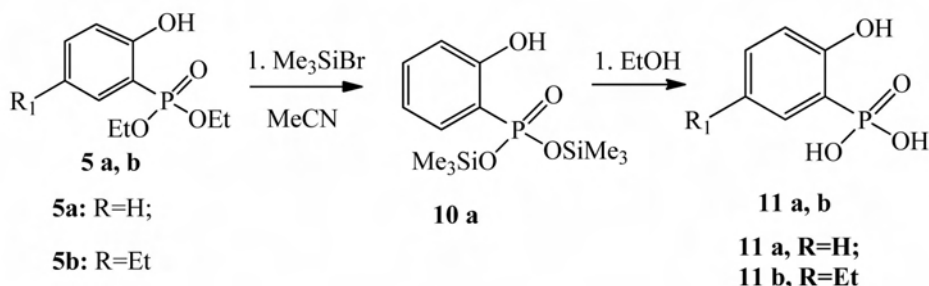


Рис. 6. Схема синтеза 2-оксифенилфосфоновой кислоты **9**.

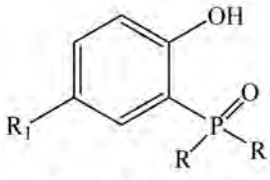
нола в соотношении (1 : 1) приводит к получению 2-оксифенилфосфонистой кислоты **9** (рис. 5) [4].

Изучены особенности получения и другого фосфорильного аналога салициловой кислоты — 2-оксифенилфосфоновой кислоты **11** (рис. 6). В частности, синтезировать кислоту **11** классическим способом — кипячением фосфоната **5a** в концентрированной HCl не удалось. Через 15 мин появлялись окрашивание и запах, характерные для фенола, который и был выделен из эфирных экстрактов реакционной смеси. Целевая кислота **11** была получена алкоголизом бис(триметилсилилового) эфира **10**, который, в свою очередь, был впервые синтезирован взаимодействием фосфоната **5a** с триметилбромсиланом (ТМБС) в кипящем ацетонитриле (см. рис. 6). Было установлено, что гидролиз соединения **10** водой при комнатной температуре приводит к соединению **11**, сильно загрязненному побочными продуктами, что затрудняет его выделение и очистку [4].

Паралельно синтетическим исследованиям интенсивно исследовались комплексообразующие, физико-химические свойства синтезированных *ortho*-фосфорилфенолов. Так, впервые синтезированы и охарактеризованы элементарным анализом и методами ИК-спектроскопии, спектроскопии ЯМР  $^1H$ ,  $^{31}P$  и LDI-TOF масс-спектрометрии лантанидные комплексы *ortho*-фосфорилфенолов  $HL_1$  и  $HL_2$  состава  $LnL_3$  ( $Ln = Pr, Sm, Eu, Tb, Dy, Lu$ ) (табл. 1). При исследовании их фотофизических свойств были оценены энергии триплетных уровней. Энергетический зазор между триплетным уровнем лиганда и резонансным уровнем иона РЗЭ ( $^5D_0$  для  $Eu^{3+}$  и  $^5D_4$  для  $Tb^{3+}$ ) оптимален для сенсibilизации люминесценции в случае комплексов  $Tb^{3+}$ , что подтвердилось яркой люминесценцией и высокими квантовыми выходами (см. табл. 1). В то же время величина энергетического зазора слишком мала для сенсibilизации люминесценции в случае комплексов  $Eu^{3+}$ , что приводит к эффективному тушению люминесценции и малым квантовыми выходами. Синтезированы люминесцентные комплексы  $Dy^{3+}$  и  $Sm^{3+}$ ,

что приводит к эффективному тушению люминесценции и малым квантовыми выходами. Синтезированы люминесцентные комплексы  $Dy^{3+}$  и  $Sm^{3+}$ ,

Таблица 1. Квантовые выходы лантанидных комплексов.

 HL <sub>1</sub> , R = p-Tol, R <sub>1</sub> = H HL <sub>2</sub> , R = Ph, R <sub>1</sub> = Et	Квантовые выходы, Φ (%)	
	Tb(L <sub>1</sub> ) <sub>3</sub>	
Tb(L <sub>2</sub> ) <sub>3</sub>		37.80
Dy(L <sub>1</sub> ) <sub>3</sub>		3.75
Dy(L <sub>2</sub> ) <sub>3</sub>		5.15
Sm(L <sub>1</sub> ) <sub>3</sub>		0.30
Sm(L <sub>2</sub> ) <sub>3</sub>		0.50

однако их квантовые выходы оказались существенно меньше (см. табл. 1), что вызвано особенностями энергетической структуры ионов. Все синтезированные комплексы оказались термически устойчивыми (температура разложения ~450°C) и летучими, что позволило получить тонкие пленки данных соединений методом напыления конденсацией из газовой фазы.

Был получен опытный образец органического светодиода со структурой ИТО/CuPc/Tb(L<sub>2</sub>)<sub>3</sub>/Al:Ca, обладающего максимальной яркостью 60 Кд·м<sup>-2</sup> и напряжением включения 5 В, который может быть еще улучшен соответствующим подбором органических слоев [5]. Впервые был получен, выделен и идентифицирован комплекс меди с *орто*-(ди(*n*-толил)фосфорилфенолом **3b**. На основании результатов исследований с привлечением ИК-, Раман-спектроскопии и метода рентгеноструктурного анализа установлено, что соединение **3b** с катионом меди проявляет мостиковую и хелатную координацию образуя полимер с димерным Cu<sub>2</sub>O<sub>8</sub>-фрагментом [6].

Получены данные и по физиологической активности ряда *орто*-фосфорилфенолов. В частности, проведено исследование анальгетической и противовоспалительной активности метоксиметилового эфира *орто*-дифенилфосфорилфенола **2a**, которое показало, что это соединение вызывает у мышей дозозависимое угнетение количества приступов корчей, вызванных внутрибрюшинным введением уксусной кислоты, а также в дозе 100 мг·кг<sup>-1</sup> уменьшает агаровый отек лапы у крыс, т.е. обладает выраженным анальгетическим и слабым противовоспалительным действием. По силе анальгетического действия **2a** находится на уровне широко используемого в клинической практике нестероидного препарата анальгин. При этом терапевтические индексы **2a** и анальгина практически одинаково-

вы — соответственно 12.8 и 12.08 [7]. Еще более ярко выраженной анальгетической и противовоспалительной активностью обладает 2-оксифенилфосфонистая кислота **9** — по анальгетическому действию это соединение в 2.3 раза активнее анальгина, а по терапевтическому индексу превосходит его в 2.4 раза. Следует отметить, что соединение **6a** малотоксично, значение LD<sub>50</sub> составляет 3500 мг·кг<sup>-1</sup> [8].

Известно, что ациклические поданды обычно уступают краун-эфирам по эффективности катионного связывания (сказывается неблагоприятное влияние энтропийного фактора), но в присутствии комплементарных катионов конформационно подвижные поданды могут образовывать псевдомакроциклические структуры, в которых реализуется кооперативное взаимодействие большинства координирующих центров с катионом, что существенно увеличивает их комплексообразующую способность. Введение в структуру поданда конформационно жестких фрагментов, как правило, существенно усиливает связывание катионов металлов за счет дополнительной степени предорганизации. Еще одной возможностью увеличения комплексообразующей способности подандов является использование эффективных координирующих группировок (фрагментов 8-оксихинолина, салициловой кислоты и др.) в качестве концевых групп. Нами был впервые синтезирован ряд фосфорилсодержащих моно-, ди- и триподандов нейтрального и кислотного типа, различающихся количеством и структурой фосфорилсодержащих фрагментов, длиной и строением полиэфирной цепи. В этих соединениях в качестве концевых групп, как правило, использовались фрагменты *орто*-фосфорилфенолов (рис. 7). Синтез фосфорилсодержащих моно-, ди- и триподандов осуществлен алкилированием соответствующих *орто*-фосфорилфенолов дитозилатами и дихлоридами полиэтиленгликолей в различных реакционных условиях. При этом впервые проведено систематическое исследование особенностей применения реакций Вильямсона и Арбузова в синтезе фосфорилподандов. Разработаны препаративные методы получения фосфорилподандов с концевыми группами нейтрального и кислотного типа с применением межфазного катализа, темплатной сборки на катионе металла и микроволнового нагрева [9].

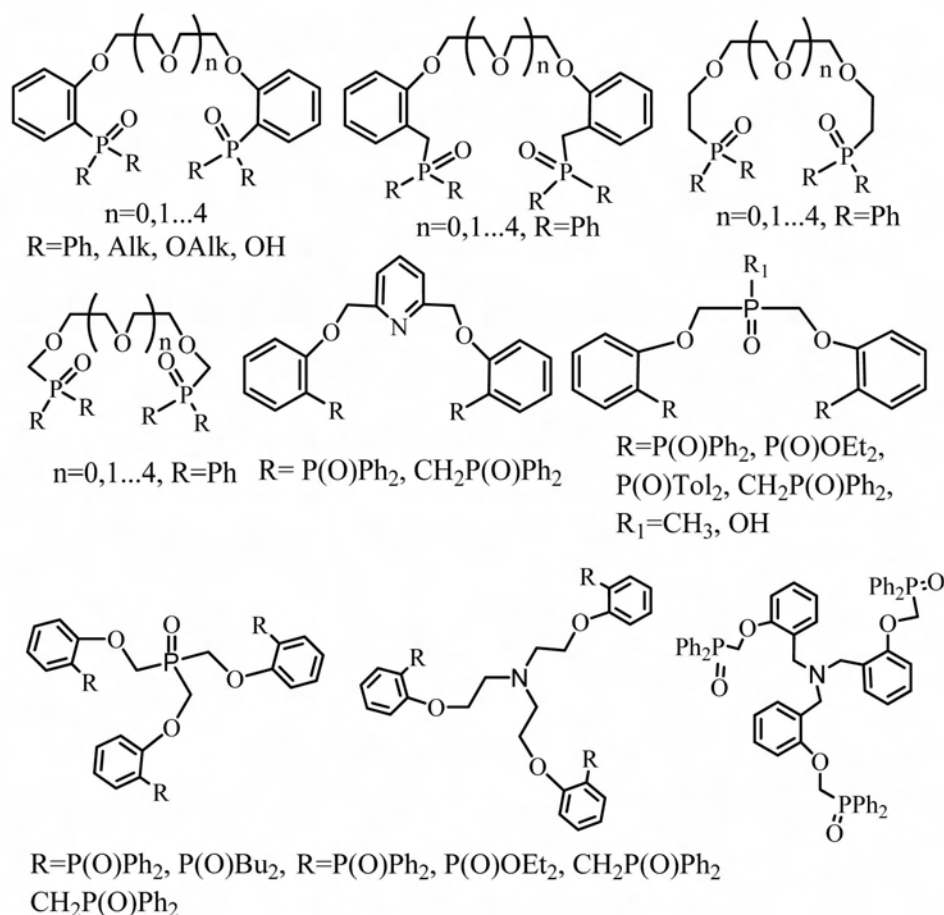


Рис. 7. Структуры синтезированных фосфорилсодержащих моно-, ди- и триподандов.



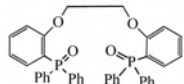

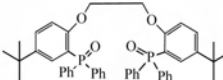
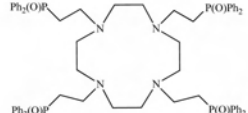
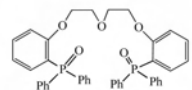
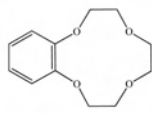
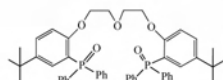

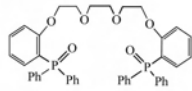
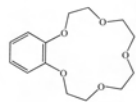
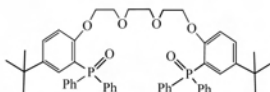

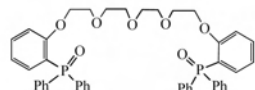
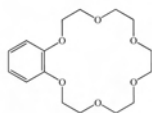
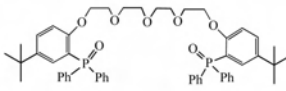
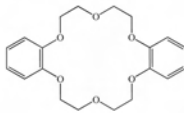
Исследована зависимость комплексообразующей способности фосфорилсодержащих моно-, ди-, и триподандов от их строения. Количественную оценку комплексообразующей способности оценивали по значениям констант устойчивости комплексов  $M^+L$ , которые определялись кондуктометрическим методом в смешанном растворителе ТГФ –  $CHCl_3$  (4:1 по объему) при  $25^\circ C$ . В табл. 2 приведены значения логарифмов констант устойчивости комплексов ( $lgK$ ) некоторых фосфорилподандов и ряда краун-эфиров с 2,4-динитрофенолятами щелочных металлов (ЩМ) в смеси ТГФ –  $CHCl_3$  (4:1 по объему) [3].

Прежде всего необходимо отметить, что значения  $lgK$  литиевых комплексов ряда фосфорилподандов существенно превышают аналогичные величины для наиболее сильных фосфорсодержащих комплексообразователей и краун-эфиров (см. табл. 2). При этом установлено, что  $lgK$  комплексов фосфорилподандов, содержащих в концевой группе *tert*-бутильный заместитель,

всегда оказываются несколько ниже, чем соответствующие значения  $lgK$  комплексов лигандов без таких заместителей. Установлено, что увеличение числа полиэфирных звеньев ( $n$ ) в структуре фосфорилподандов приводит, как правило, к увеличению комплексообразующей способности по отношению ко всем катионам ЩМ. Наиболее отчетливо эта тенденция проявляется в случае катионов большого радиуса —  $K^+$ ,  $Rb^+$  и  $Cs^+$ , что нашло свое отражение в монотонном увеличении  $lgK$  с ростом  $n$ . Для катионов малого радиуса  $Li^+$  и  $Na^+$  зависимости  $lgK$  от  $n$  не являются монотонными. В случае катиона  $Li^+$  наблюдаются два резко выраженных максимума при  $n = 1$  и  $3$  и один минимум при  $n = 2$ , а для катиона  $Na^+$  — один максимум при  $n = 4$ . Характер зависимостей  $lgK$  от длины полиэфирной цепочки лиганда, по-видимому, обусловлен жесткими пространственными требованиями катионов  $Li^+$  и  $Na^+$  к структуре фосфорилподанда, которая не при всех значениях  $n$  обеспечивает оптимальное участие донорных центров во взаи-



**Таблица 2.** Логарифмы констант устойчивости комплексов ( $\lg K$ ) фосфорилподандов и ряда краун-эфиров с 2,4-динитрофенолятами щелочных металлов в смеси ТГФ –  $\text{CHCl}_3$  (4 : 1 по объему).

Формула	$\lg K$					Формула	$\lg K$				
	$\text{Li}^+$	$\text{Na}^+$	$\text{K}^+$	$\text{Rb}^+$	$\text{Cs}^+$		$\text{Li}^+$	$\text{Na}^+$	$\text{K}^+$	$\text{Rb}^+$	$\text{Cs}^+$
	3.5	2.4	1.8	1.6	–		5.4	6.2	5.8	5.5	4.7
	5.8	4.8	3.7	3.3	2.9		5.3	6.0	5.6	5.3	4.7
	5.6	4.7	3.8	3.3	2.8		5.9	6.3	5.0	–	3.6
	4.6	4.8	3.7	3.6	3.0		2.8	3.0	2.6	2.4	2.2
	4.6	4.6	3.8	3.5	3.0		4.6	4.9	4.9	4.7	4.0
	7.0	6.1	4.8	4.4	3.8		3.9	4.5	4.4	3.8	3.3
	6.8	5.9	4.8	4.4	3.8		5.5	6.6	5.5	4.9	4.5
	5.6	6.6	5.7	5.1	4.5		5.1	6.3	5.4	4.7	4.5
	5.4	6.2	5.3	5.0	4.4		5.6	6.0	5.0	4.6	4.4

модействии с катионом  $\text{M}^+$ . С этой точки зрения структуры тетра- и гексадентатных моноподандов в случае катиона  $\text{Li}^+$  и гептадентатных моноподандов в случае катиона  $\text{Na}^+$  оказываются наиболее благоприятными для достижения оптимального расположения всех донорных центров лиганда вокруг  $\text{M}^+$ , что подтверждается высокими значениями  $\lg K$  соответствующих комплексов, особенно с катионом  $\text{Li}^+$ . Впоследствии нами были впервые получен кристаллический комплекс гексадентатного ФП с катионом  $\text{Li}^+$ . Данные РСА подтвердили количественный состав и оптимальное пространственное рас-

положение координирующ центров (рис. 8) [10–12].

Проведенное изучение моноподандов выявило высокую и во многом уникальную комплексообразующую способность фосфорилподандов по отношению к катионам ЩМ и прежде всего, к катиону  $\text{Li}^+$ . Логично было продолжить дальнейший поиск соединений с высокой комплексообразующей способностью к катиону  $\text{Li}^+$  среди соединений с большим количеством фосфорильных групп в молекуле. Поэтому нами были впервые получен ряд ди- и триподандов нейтрального и кислотного типа. Данные по

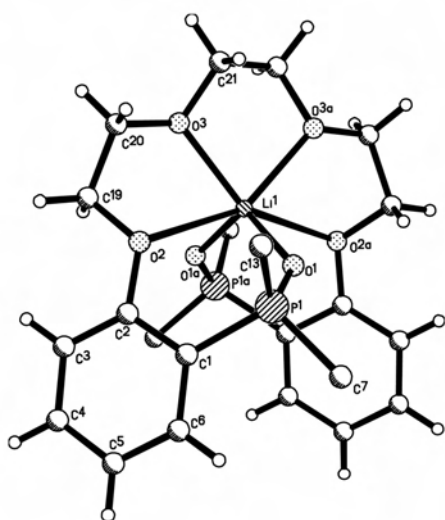


Рис. 8. Строение комплексного катиона  $[LiL^3]^+$ . Для упрощения рисунка у концевых фенильных циклов показаны только атомы углерода, связанные с атомами фосфора.

комплексообразующей способности нейтральных фосфорилсодержащих ди- и триподандов по отношению к 2,4-динитрофенолятам щелочных металлов кондуктометрическим методом в смешанном растворителе ТГФ– $CHCl_3$  (4:1 по объему) представлены в табл. 3. Там же для сравнения представлены аналогичные данные для наиболее близких по дентатности моноподандов.

При сравнении эффективности взаимодействия с катионами ЩМ диподанда и равного ему по дентатности моноподанда необходимо отметить, что дополнительное введение такого сильного координирующего центра как фосфорильная группа не приводит к увеличению комплексообразующей способности по отношению к катионам  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Rb^+$  и  $Cs^+$ . В случае же катиона  $Li^+$  происходит довольно существенное упрочнение комплекса. По-видимому, только при взаимодействии с катионом  $Li^+$ , обладающим минимальным радиусом в ряду щелочных металлов, реализуется эффективное взаимодействие большинства донорных центров диподанда с катионом. Увеличение радиуса катиона, по-видимому, затрудняет реализацию комплементарного расположения донорных центров диподанда при координации с катионами  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Rb^+$  и  $Cs^+$ . Особенностью ряда диподандов является проявление высокой  $Li^+/Na^+$ -селективности (см. табл. 3). Наличие трех полиэфирных фрагментов с конформационно

жесткой 2-дифенилфосфорилфенильной концевой группой приводит к довольно существенному увеличению комплексообразующей способности триподанда по сравнению с диподандом. Причем триподанд, имея большее число таких сильных донорных центров, как фосфорильная группа, незначительно уступает по эффективности взаимодействия с катионом  $Li^+$  более синтетически доступному изодентатному моноподанду. Вероятно, и в этом случае конформационно жесткая структура триподанда препятствует в полной мере реализации кооперативного взаимодействия большинства донорных центров с катионом. Тем не менее, в целом изученные ди- и триподанды являются довольно

Таблица 3. Логарифмы констант устойчивости комплексов ( $lgK$ ) фосфорилсодержащих ди- и триподандов и моноподандов с 2,4-динитрофенолятами щелочных металлов в смеси ТГФ– $CHCl_3$  (4:1 по объему).

Формула	$lgK$					$K_{Li}/K_{Na}$
	$Li^+$	$Na^+$	$K^+$	$Rb^+$	$Cs^+$	
	6.0	5.0	4.0	3.7	3.3	10.0
	6.1	5.1	4.1	3.7	3.2	10.0
	6.2	4.6	3.3	3.2	2.7	39.8
	6.9	5.9	4.8	4.4	3.9	10.0
	4.6	4.8	3.7	3.6	3.0	0.1
	5.0	4.3	3.1	2.8	2.3	5.0
	7.0	6.1	4.8	4.4	3.8	10.0

эффективными и селективными лигандами по отношению к катионам щелочных металлов [9].

Высокие значения  $\lg K$  устойчивости комплексов ряда фосфорилподандов с катионами ЩМ послужили толчком к изучению процессов жидкостной экстракции этих элементов из водных растворов. Первое исследование экстракционных свойств ряда фосфорилподандов было выполнено для пикратов ЩМ и щелочноземельных металлов (ЩЗМ) из водных растворов. Полученные результаты показали, что для пикрата лития значения коэффициентов распределения ( $D$ ) в  $\text{HCl}_3$  максимальны для пентадентатных фосфорилподандов, в то время как пикрат натрия наиболее эффективно экстрагирует пента- и гексадентатные соединения. Для других щелочных металлов значения  $D$  с увеличением дентатности, как правило, проходят через максимум, который соответствует оптимальному количеству донорных центров в ФП. В сопоставимых экспериментальных условиях ФП проявляют существенно меньшую экстракционную способность по отношению к пикратам ЩМ по сравнению с краун-эфирами, содержащими от 4 до 8 атомов кислорода. Пикраты щелочноземельных металлов (ЩЗМ) по сравнению с пикратами ЩМ в целом более эффективно экстрагируются фосфорилподандами. Максимальные значения коэффициента распределения получены при экстракции пикрата стронция, причем они последовательно возрастают с увеличением длины полиэфирной цепи, то есть с увеличением числа донорных центров в фосфорилподанде. Пикрат магния независимо от длины полиэфирной цепи экстрагируется ФП лучше, чем краун-эфирами, в то же время пикрат кальция экстрагируется фосфорилподандами на уровне таких краун-эфиров как диаза-18-краун-6 и дициклогексил-18-краун-6 (изомер А) [13–15].

Исследования экстракции  $\text{Sc(III)}$  и  $\text{Pd(II)}$  фосфорилсодержащими подандами в дихлорэтан (ДХЭ) из солянокислых сред выявили заметное влияние числа донорных центров и конформационной жесткости концевых групп на значения коэффициентов распределения. При относительно низкой концентрации  $\text{HCl}$  (4.5 М) наибольшей экстракционной способностью по отношению к скандию обладает поданд с тремя этиленгикольевыми звеньями. Увеличение числа полиэфирных звеньев приводит к монотонному

уменьшению величины коэффициента распределения скандия ( $D_{\text{Sc}}$ ). Для некоторых ФП эта зависимость имеет экстремальный характер, причем в случае пентадентатных подандов величина  $D_{\text{Sc}}$  имеет максимальное значение. Следует отметить, что поданды с жестким *орто*-фениленовым фрагментом экстрагируют скандий наименее эффективно. Наибольшей экстракционной способностью по отношению к скандию в солянокислых средах обладают конформационно подвижные поданды. По-видимому, в этих случаях образуются гидрофобные координационные соединения с участием сольватированного катиона  $\text{Sc}^{3+}$ , обеспечивающие его эффективный переход в органическую фазу. При увеличении концентрации соляной кислоты до 6.2 М характер таких зависимостей несколько изменяется. При такой кислотности водной фазы  $D_{\text{Sc}}$  относительно мало зависит от числа атомов кислорода и величина  $D_{\text{Sc}}$  даже уменьшается по сравнению с экстракцией скандия этим соединением из 4.5 М раствора  $\text{HCl}$ . По-видимому, при высокой кислотности водной фазы наблюдается более сильное влияние соэкстракции  $\text{HCl}$  фосфорилподандами, которая подавляет извлечение скандия в органическую фазу.

В случае  $\text{Pd(II)}$ , который, как известно, экстрагируется из солянокислых сред в виде анионных хлоркомплексов, зависимость значений  $D_{\text{Pd}}$  от числа донорных центров ( $m$ ) в молекуле фосфорилподандов имеет экстремальный характер с максимумами для пентадентатных соединений [16, 17].

При изучении экстракции золота и платины из солянокислых растворов в ДХЭ фосфорилсодержащими подандами установлено, что характер изменения величин  $D$  для этих элементов в зависимости от числа донорных центров в целом симбатен аналогичным экстремальным зависимостям для палладия [18, 19].

Изучение экстракции рения ФП различного строения показало, что величины коэффициентов распределения анионных комплексов  $\text{ReO}_4^-$ , экстрагируемых из 3 М раствора  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , существенным образом зависят от строения концевого фрагмента и количества атомов кислорода полиэфирной цепи, а аналогичные значения  $D_{\text{Re}}$  между водными растворами хлоридов щелочных металлов и растворами подандов в ДХЭ линейно увеличиваются в ряду  $\text{CsCl} < \text{RbCl} <$

$KCl < NaCl < LiCl$ . В такой же последовательности изменяются и значения констант устойчивости комплексов щелочных металлов с этими соединениями в среде смешанного растворителя ТГФ –  $CHCl_3$  (4 : 1). По-видимому, в этом случае катионной частью экстрагируемого комплекса является гидратированный катион ЩМ. Максимальные значения  $D_{Re}$  получены для пентадентатных фосфорилподандов, как это было в случае экстракции палладия [20].

Таким образом, результаты изучения экстракционной способности фосфорилподандов нейтрального типа по отношению к s- и d-элементам показали, что в целом ряде случаев как экстрагенты они превосходят макроциклические краун-эфиры (дициклогексил-18-краун-6 и дибензо-18-краун-6) и монодентатные нейтральные фосфорорганические соединения (ТБФ, ТОФО и диоксиды фосфинов). Но ФП оказались малоэффективными экстрагентами для f-элементов. К примеру эффективность экстракции  $UO_2^{2+}(Pic)_2$  гексадентатным фосфорилподандом сравнима с монодентатными окисями трифенил- и триоктилфосфина. Методом РСА была установлена структура уранильного комплекса, в котором, в отличие от комплексов сферических катионов, в координации с катионом уранила участвует только одна фосфорильная группа четырех независимых молекул [21].

Более эффективными экстрагентами для f-элементов оказались фосфорилподанды кислотного типа — производные дифосфоновых кислот (рис. 9).

Методом РСА было установлено, что наличие оксигрупп при атоме фосфора в этих соединениях приводит к образованию внутримолекулярных (рис. 10) и межмолекулярных водородных связей (рис. 11), что существенным образом может повлиять на экстракционную способность фосфорилподандов этого класса. Действительно, данные по извлечению U(VI), Th(IV) и La(III) из азотной кислоты растворами фосфорилподандов кислотного типа в ДХЭ показывают, что все изученные соединения эффективно извлекают Th(IV) и при этом практически не экстрагируют La(III).

При экстракции Th(IV) зависимость  $lgD$  от длины полиэфирной цепи носит экстремальный характер с максимумом для полуэфира дифосфоновой кислоты — производного диэтиленгли-

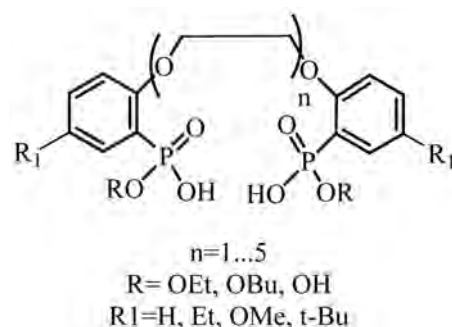


Рис. 9. Структуры диподандов — производных дифосфоновых кислот.

коля. При переходе от двухосновных полуэфиров к тетраосновным фосфоновым кислотам происходит существенное снижение экстракционной способности по отношению к Th(IV), при этом значения коэффициентов распределения U(VI) практически не изменяются. Полные диэтиловые эфиры дифосфоновых кислот в тех же условиях практически не экстрагируют U(VI) и Th(IV) [22]. Проведено сравнение свойств ряда фосфорил-

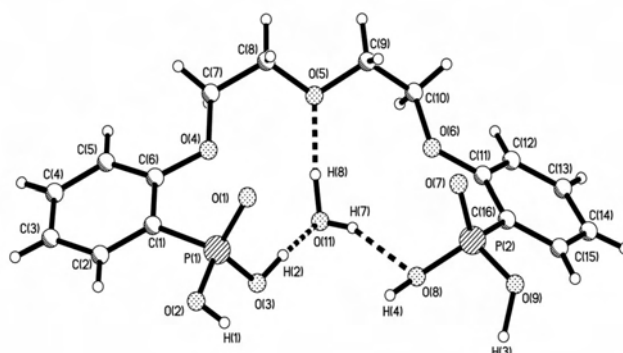


Рис. 10. Кристаллическая структура гидрата **55b**.

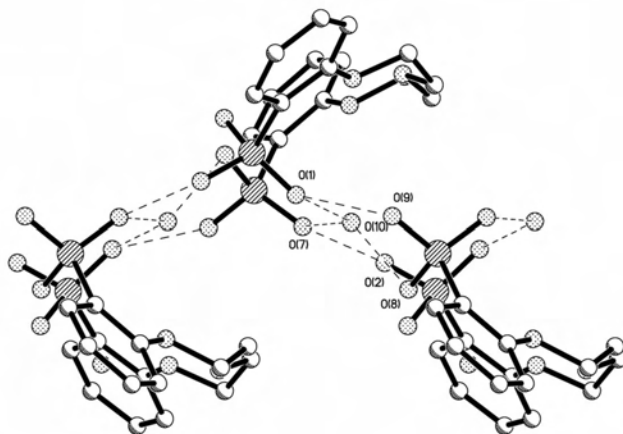


Рис. 11. Фрагмент цепочки структуры **55b** вдоль оси с.

подандов кислотного типа, различающихся строением концевых групп, при экстракции U(VI), Th(IV), La(III), Ne(III), Ho(III) и Yb(III) из азотнокислых растворов в 1,2-дихлорэтан. Установлено, что наиболее эффективными экстрагентами для избирательного извлечения Th(IV) и U(VI) в присутствии лантанидов являются поданды — производные 1,5-бис[2-(оксизетоксифосфинил)фенокси]-3-оксапентана, количественно извлекающие актиниды при малых концентрациях азотной кислоты. По данным светорассеяния в экстрактах тория, урана и неодима обнаружены мицеллярные агрегаты размером 6–90, 7–70 и 9–20 нм соответственно. Методом ИК-спектроскопии и элементного анализа установлен состав и строение экстрагируемых комплексов урана [23]. Методом диффузии определена степень ассоциации фосфорилсодержащих кислотных подандов в 1,2-дихлорэтаноле, 1,2-дихлорэтаноле, насыщенном водой и в водном метанольном (1:7 по объему) растворах. Установлено, что в одинаковых экспериментальных условиях (25°C, 0.01 М растворы в водном метаноле) фосфорилподанды кислотного типа могут существовать как в виде тримеров, так и образовывать ассоциаты, состоящие примерно из 30 частиц. По данным ИК-спектроскопии в растворах в 1,2-дихлорэтаноле ассоциаты обоих подандов образованы за счет сильных водородных связей с участием групп P(O)OH [24]. С целью увеличения растворимости дифосфоновых кислот в органических растворителях нами были синтезированы фосфорилподанды кислотного типа с этильным и *трет*-бутильным заместителями в 4,4'-положениях фенильного кольца. Эти соединения оказались наиболее эффективными экстрагентами для избирательного извлечения Th(IV) в ряду U(VI) и La(III) из азотнокислых сред и были запатентованы [25, 26].

Известно, что работа атомной промышленности связана с накоплением значительных количеств радиоактивных отходов, в которых содержится значительные количества ценных радионуклидов. Для их выделения целесообразно использование экстракционно-хроматографических методов. Для их реализации необходимо располагать широким набором сорбционных материалов, однако в настоящее время такие материалы серийно в России не выпускаются, а стоимость аналогичной продукции зарубежных

компаний достаточно высока. Поэтому создание новых эффективных сорбентов с заданными свойствами и разработка методик их практического использования является актуальной задачей. Среди известных типов экстракционно-хроматографических материалов наиболее перспективными являются сорбенты, в которых в качестве активных компонентов неподвижной фазы используются комплексообразующие органические соединения, нековалентным образом закрепленные на поверхности полимерного носителя (так называемые импрегнированные сорбенты). При этом выбор комплексообразующего агента производится, как правило, из соединений, описанных в литературе. Такой подход требует трудоемкого исследования сорбционной способности полученных материалов и условий селективного выделения металлов и в конечном итоге не гарантирует эффективности сорбента. В настоящей работе в качестве комплексообразующих компонентов импрегнированных сорбентов нами использовались специально синтезированные фосфорилподанды, комплексообразующие свойства которых были предварительно оптимизированы на основании результатов систематического изучения экстракции из растворов, состав которых максимально приближен к реальным технологическим условиям. В частности, в качестве комплексообразующих компонентов сорбентов импрегнированного типа был исследован ряд фосфорилподандов кислотного типа, различающихся длиной полиэфирной цепи и строением концевой группы. В качестве материала матрицы использовался сополимер стирола с дивинилбензолом марки LPS-500. Методом экстракционной хроматографии в динамическом режиме исследованы закономерности сорбции молибдена от качественного и количественного состава сорбентов из модельных растворов молибдата аммония в HNO<sub>3</sub>. В результате разработан, оптимизирован состав и определены условия практического применения нового комплексообразующего сорбента импрегнированного типа для селективного извлечения молибдена из азотнокислых растворов. Установлено, что разработанный сорбент позволяет осуществить эффективное извлечение <sup>99</sup>Mo и его очистку от продуктов переработки облученных урановых материалов из технологических растворов ПО «МАЯК», а также способен

разделять изотопы  $^{99}\text{Mo}$  и  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , что делает его потенциально пригодным для использования в генераторах  $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$  хроматографического типа [27, 28].

Сорбенты импрегнированного типа на основе фосфорилподандов кислотного типа изучались в процессах выделения редкоземельных элементов. При этом исследовано влияние структуры и количества нанесенного фосфорилподанда, концентрации и природы кислоты в исходном растворе РЗЭ на экстракционно-хроматографическое разделение  $\text{La}^{3+}$ ,  $\text{Nd}^{3+}$ ,  $\text{Pm}^{3+}$  и  $\text{Sm}^{3+}$  в динамическом режиме. Установлено, что по эффективности разделения этих элементов из слабокислых сред разработанные сорбенты существенно превосходят известные аналоги, изготовленные на основе традиционно используемых экстрагентов — ди(2-этилгексил)фосфорной кислоты и  $N,N,N',N'$ -тетра-*n*-октилдигликольамида. Показана возможность практического применения полученных сорбентов для селективного извлечения и очистки Pm-147 от ряда сопутствующих РЗЭ из технологических растворов ПО «МАЯК» [29]. Осуществлено экстракционно-хроматографическое разделение U(VI), Th(IV), Np(IV) и Pu(IV) сорбентами, импрегнированным фосфорилподандом кислотного типа 1,5-бис[2-(оксиэтоксифосфинил)-4-(этил)фенокси]-3-оксапентаном, а также его смесями с четвертичным аммониевым основанием — нитратом метилтриоктиламмония. Изучено влияние состава неподвижной фазы и концентрации азотной кислоты на сорбцию актиноидов. Обнаружен синергетический эффект при извлечении актинидов сорбентами, содержащими смесь фосфорилподанда и нитрата метилтриоктиламмония. На основании полученных результатов предложен ряд методик разделения Np(IV), Pu(IV), Th(IV) и U(VI) в продуктах переработки отработанного ядерного топлива [31]. Осуществлено экстракционно-хроматографическое выделение Np(IV) и Pu(IV) из рафинатных растворов переработки отработанного ядерного топлива (ОЯТ) полимерным сорбентом, импрегнированным смесью фосфорилподанда кислотного типа — 1,5-бис[2-(оксиэтоксифосфинил)-4-(этил)фенокси]-3-оксапентаном, с четвертичным аммониевым основанием нитратом метилтриоктиламмония. Изучено влияние концентрации азотной кислоты, оксалата аммония

на сорбцию нептуния, плутония, урана, тория и циркония. Предложены методики измерений содержания Np(IV) и Pu(IV) в продуктах переработки ОЯТ в варианте высокоэффективной жидкостной хроматографии со спектрофотометрическим детектированием. Пределы обнаружения нептуния и плутония составили  $5 \cdot 10^{-5} \text{ г} \cdot \text{дм}^{-3}$  и  $1.3 \cdot 10^{-5} \text{ г} \cdot \text{дм}^{-3}$  соответственно. Еще одним несомненным достоинством является небольшая продолжительность анализа с учетом выполнения двух параллельных определений — не более 40 мин [32].

Основным итогом проделанной работы является развитие нового научного направления в химии ациклических полиэфирных комплексообразующих соединений — синтез и исследование свойств фосфорилсодержащих подандов. Главным результатом работы стал синтез большого ряда новых фосфорилподандов различной дентатности нейтрального и кислотного типа. Установлены основные корреляции между строением фосфорилподандов и их комплексообразующей и экстракционной способностью по отношению к s-, d- и f-элементам. В частности, разработаны высокоэффективные методы синтеза и функционализации *орто*-фосфорилированных фенолов различного строения — исходных соединений для получения фосфорилподандов. Впервые проведено систематическое исследование особенностей использования реакций Вильямсона и Арбузова в синтезе фосфорилподандов. Разработаны препаративные методы получения фосфорилподандов с концевыми группами нейтрального и кислотного типов с применением межфазного катализа, темплатной сборки на катионе металла и микроволнового нагрева. Установлено, что фосфорилподанды обладают высокой комплексообразующей способностью по отношению к катионам щелочных металлов, при этом эффективность связывания определяется строением концевого фрагмента и числом звеньев в полиэфирной цепи. Синтезированы фосфорилподанды, эффективно связывающие катионы  $\text{Li}^+$  и  $\text{Cs}^+$ , а также обладающие высокой  $\text{Li}^+/\text{Na}^+$ -селективностью, превосходящие по этим параметрам известные фосфорилсодержащие лиганды, а также краун-эфиры (18-краун-6 и дибензо-18-краун-6). Изучено влияние строения концевых групп на комплексообразующую способность

фосфорилподандов. По аналогии с макроциклическим эффектом сформулировано понятие фосфорильного эффекта как меры повышения комплексообразующей способности фосфорсодержащего моноподанда по отношению к катионам щелочных металлов по сравнению с изодентатным глимом. Проведено сопоставление обоих эффектов в зависимости от числа донорных центров в молекуле лиганда, природы катиона металла, строения концевых групп фосфорильных подандов и свойств растворителя. Впервые получены в виде монокристаллов и установлены методом РСА структуры пентадентатного 1,5-бис(2-дифенилфосфорилметил)фенокси-3-оксапентана и гексадентатного 1,8-бис(2-дифенилфосфорилметил)фенокси-3,6-диоксаоктана. Установлена кристаллическая и молекулярная структура иодидных комплексов цинка и кадмия с 1,5-бис(2-дифенилфосфорилметил)феноксиэтаном. Впервые синтезированы и структурно охарактеризованы комплексы пяти- и шестивалентных актинидов (U, Np, Pu) с 1,8-бис(2-дифенилфосфорил)фенокси-3,6-диоксаоктаном и 1,8-бис(2-дифенилфосфорилметил)фенокси-3,6-диоксаоктаном. Установлены основные корреляции между структурой фосфорилсодержащих подандов и экстракционной способностью по отношению к ряду s-, d- и f-элементов. На основе фосфорилподандов — производных дифосфоновых кислот разработаны сорбционные материалы для селективного разделения радионуклидов, на основе которых осуществлено практическое экстракционно-хроматографическое разделение U(VI), Th(IV), Np(IV) и Pu (III) из азотнокислых растворов. Предложена и внедрена методика анализа содержания нормируемых примесей в товарной продукции на ФГУП «ПО Маяк» (г. Озерск Челябинская область).

Работа выполнена в рамках Государственного задания 2018 года (темы № 0090-2017-0024 и 0081-2014-0015) и при частичной поддержке Программы Президиума РАН № 34, а также гранта РФФИ № 18-33-00685.

## Литература

1. Е.Н.Цветков, В.Х.Сюндюкова, В.Е.Баулин. *Журн. общей химии*, **57** (11), 2456–2461 (1987)
2. В.Е.Баулин, В.Х.Сюндюкова, Е.Н.Цветков. *Журн. общ. химии*, **59** (1), 62–67 (1989)
3. В.И.Евреинов, В.Е.Баулин, З.Н.Вострокнутова, З.В.Сафронова, И.Б.Крашакова, В.Х.Сюндюкова, Е.Н.Цветков. *Изв. АН СССР. Сер. хим.*, (9), 1992–2000 (1991)
4. В.Е.Баулин. Синтез и комплексообразующая способность подандов с фосфинилфенильными концевыми группами. *Автореф. дисс. канд. хим. наук*, Москва. 1988. 20 с.
5. S.Shuvaev, O.Kotova, V.Utochnikova, A.Vaschenko, L.Puntus, V.Baulin, N.Kuzmina, A.Tzivadze. *Inorganic Chemistry Communications*, **20**, 73–76 (2012)
6. S.Shuvaev, I.S.Bushmarinov, I.Sinev, A.O.Dmitrienko, K.A.Lyssenko, V.Baulin, W.Grünert, A.Yu.Tzivadze, N.Kuzmina. *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2013** (27), 4823–4831 (2013)
7. В.Е.Баулин, Б.К.Безноско, В.Х.Сюндюкова, В.М.Усанова, Е.Н.Цветков. Авт. свид. СССР № 156320 (1988)
8. В.Е.Баулин, Б.К.Безноско, В.Х.Сюндюкова, В.М.Усанова, Е.Н.Цветков. Авт. свид. СССР № 1626657 (1989)
9. В.Е.Баулин. *Фосфорилподанды. Синтез, свойства и применение*. Автореф. дисс. докт. хим. наук, Черноголовка. 2012. 40 с.
10. Л.Х.Миначева, И.С.Иванова, И.К.Киреева, В.Г.Сахарова, А.Ю.Цивадзе, М.А.Порай-Кошиц. *Координационная химия*, **19** (3), 1986–1993 (1993)
11. Л.Х.Миначева, В.Е.Баулин, В.Г.Сахарова. *Координационная химия*, **21** (3), 236–240 (1995)
12. И.С.Иванова, И.Н.Полякова, В.Е.Баулин, Е.Н.Пятова, Е.С.Криворотько, А.Ю.Цивадзе. *Журн. общей химии*, **86** (4), 679–689 (2016)
13. А.Ю.Цивадзе, А.В.Левкин, С.В.Бондарева, В.Е.Баулин, Е.Н.Цветков. *Журн. неорг. химии*, **36** (9), 445–448 (1991)
14. А.Ю.Цивадзе, С.В.Бондарева, А.В.Левкин, В.Е.Баулин, Е.Н.Цветков. *Журн. неорг. химии*, **38** (7), 1251–1253 (1993)
15. A.Y.Nazarenko, V.E.Baulin, J.D.Lamb, T.A.Volkova, A.A.Varnek, G.Wipff. *Solv. Extr. Ion Exch.*, **17** (3), 495–523 (1999)
16. А.Н.Туранов, Н.К.Евсеева, В.Е.Баулин, Е.Н.Цветков. *Журн. неорг. химии*, **40** (5), 861–865 (1995)
17. А.Н.Туранов, В.Е.Баулин, А.Ф.Солотнов, Е.Н.Цветков. *Журн. неорг. химии*, **40** (5), 866–871 (1995)
18. А.Н.Туранов, В.Е.Баулин, А.В.Харитонов, Е.Н.Цветков. *Журн. неорг. химии*, **39** (8), 1394–1399 (1994)
19. А.Н.Туранов, В.К.Карандашев, В.Е.Баулин, Е.Н.Цветков. *Журн. неорг. химии*, **40** (11), 1926–1930 (1995)
20. А.Н.Туранов, В.К.Карандашев, В.Е.Баулин. *Журн. неорг. химии*, **51** (4), 735–742 (2006)
21. И.А.Чарушникова, В.Е.Баулин, А.М.Федосеев, А.Ю.Цивадзе, З.А.Старикова. *Координационная химия*, **36** (2), 1–9 (2010)
22. А.М.Сафиулина, А.Г.Матвеева, Д.В.Иванец, Е.М.Кудрявцев, М.С.Григорьев, В.Е.Баулин, А.Ю.Цивадзе. *Изв. АН. Сер. хим.*, (1), 161–168 (2015)
23. А.М.Сафиулина, А.Г.Матвеева, Д.В.Иванец, Е.М.Кудрявцев, В.Е.Баулин, А.Ю.Цивадзе. *Изв. АН. Сер. хим.*, (1), 169–175 (2015)

24. Г.И.Тимофеева, А.Г.Матвеева, А.М.Сафиулина, Д.В.Иванец, Е.М.Кудрявцев, В.Е.Баулин, А.Ю.Цивадзе. *Изв. АН. Сер. хим.*, (1) 224–227 (2015)
25. Д.В.Баулин, В.Е.Баулин, А.М.Сафиулина, Г.А.Цивадзе. 1,5-Бис[2-(оксизтоксифосфинил)-4-(трет-бутил)фенокси]-3-оксапентан в качестве лиганда для избирательного извлечения Тория(IV) в ряду Урана(VI) и Лантана(III) из азотнокислых сред. Патент РФ № 2352576 (2009)
26. А.Ю.Цивадзе, В.Е.Баулин, Д.В.Баулин, И.Г.Тананаев, А.М.Сафиуллина. 1,5-Бис[2-(оксизтоксифосфинил)-4-(этил)фенокси]-3-оксапентан в качестве лиганда для избирательного извлечения Тория(IV) в ряду Урана(VI) и Лантана(III) из азотнокислых сред. Патент РФ № 2391349 (2010)
27. В.Е.Баулин, О.В.Коваленко, А.Н.Туранов, В.К.Карандашев, А.Н.Усолкин, Н.Г.Яковлев, Ю.А.Ворошилов, А.Ю.Цивадзе. *Радиохимия*, (1), 53–59 (2015)
28. В.Е.Баулин, Д.В.Баулин, О.В.Коваленко, А.Ю.Цивадзе, А.Н.Усолкин, Ю.А.Ворошилов, Н.Г.Яковлев. Состав экстракционно-хроматографического материала для селективного извлечения Мо-99 из облученного уранового топлива. Патент РФ № 22489501 (2013)
29. В.Е.Баулин, А.В.Баулин, Д.В.Баулин, О.В.Коваленко, А.Ю.Цивадзе, А.Н.Усолкин, Н.Г.Яковлев. Состав экстракционно-хроматографического материала для селективного выделения и очистки прометия-147 от сопутствующих редкоземельных элементов из азотнокислых растворов. Патент РФ № 2574595 (2015)
30. В.Е.Баулин, И.П.Калашникова, В.Е.Баулин, О.В.Коваленко, Д.В.Баулин, А.Н.Усолкин, А.Ю.Цивадзе. *Физикохимия поверхности и защита материалов*, **52** (6), 604–612 (2016)
31. Е.В.Чухланцева, А.Н.Усолкин, О.В.Коваленко, Л.К.Неудачина, В.Е.Баулин, А.Ю.Цивадзе. *Аналитика и контроль*, **17** (2), 219–227 (2013)
32. Е.В.Чухланцева, А.Н.Усолкин, В.Е.Баулин, О.В.Коваленко, Л.К.Неудачина, А.Ю.Цивадзе.



# Сорбция лекарственных препаратов аминомодифицированными лиогелями

С.А.Лермонтов, Н.А.Сипягина

*Лаборатория новых синтетических методов ИФАВ РАН*

Аэрогели — класс мезопористых материалов, обладающих уникальными характеристиками, такими как высокая пористость, низкая плотность, высокая удельная площадь поверхности и низкая теплопроводность [1]. Аэрогели находят применение в качестве высокоэффективных теплоизоляторов, основы для катализаторов, сорбентов [2–4].

Высокая удельная площадь поверхности и сорбционная емкость оксидных аэрогелей делают их объектом пристального внимания с точки зрения использования в качестве средств доставки лекарств (DDS — drug delivery systems). Нами были синтезированы лиогели путем согелирования тетраэтоксисилана и Заминопропилтриалкоксисилана. Для проведения экспериментов по сорбции нами были использованы растворы химических соединений, моделирующих лекарственные препараты — бензойной и салициловой кислот. В качестве растворителя для приготовления растворов кислот выступал изопропиловый спирт. Концентрация и объем кислот были подобраны таким образом, чтобы количество каждой кислоты соответствовало количеству аминогрупп в лиогелях. Лиогели помещали в равные объемы растворов кислот и через определенное время измеряли концентрацию кислот в растворе. В качестве контрольных образцов использовали гели, полученные гидролизом тетраэтоксисилана по стандартной методике.

Было показано, что в результате сорбции на аминомодифицированных гелях концентрация бензойной кислоты в растворе снижалась в 3.8 раз, а салициловой — в 5.1 раз. Таким образом, на аминомодифицированных гелях было сорбировано ~75% кислот. В контрольном эксперименте концентрация кислот в обоих случаях уменьшилась только в ~2.5 раза.

В следующем эксперименте в качестве растворителя нами был применен метил-трет-бутиловый эфир (МТБЭ). Мы ожидали, что за счет меньшей полярности растворителя сорбция кислот будет выше, чем в изопропанол.

Установлено, что коэффициент распределения для бензойной кислоты между неподвижной и подвижной фазами (аэрогель и растворы кислот в МТБЭ) составляет 2.5, а для салициловой кислоты — 1.7. Таким образом, более полярный изопропанол способствует лучшей сорбции карбоновых кислот на аэрогелях на основе аминопил-модифицированного силикагеля. Использование водных растворов в качестве подвижной фазы представляется нецелесообразным в связи с низкой растворимостью в ней соответствующих кислот.

Таким образом, на модельной системе было показано, что аминомодифицированные гели могут являться эффективными сорбентами для некоторых лекарственных препаратов. Мы ожидаем, что аналогичные свойства проявят и соответствующие аэрогели.

## Литература

1. *Aerogels Handbook* (Eds M.A.Aegerter, N.Leventis, M.M.Koebel). Springer, New York, 2011
2. B.P.Jelle, R.Baetens, A.Gustavsen. *Sol-Gel Handb.*, **3**, 1385–1412 (2015)
3. A.V.Rao, N.D.Hegde, H.Hirashima. *J. Colloid Interface Sci.*, **305**, 124–132 (2007)

**С.А.Лермонтов.** Доктор химических наук, профессор, заведующий лабораторией новых синтетических методов ИФАВ РАН. e-mail: lermontov52@yandex.ru  
**Н.А.Сипягина.** Младший научный сотрудник лаборатории новых синтетических методов ИФАВ РАН. e-mail: dolmatin\_89@mail.ru

# Аэрогели — синтез, свойства и практическое применение †

С.А.Лермонтов<sup>1</sup>, А.Н.Малкова<sup>1</sup>, Н.А.Сипягина<sup>1</sup>, Е.А.Страумал<sup>1</sup>,  
Л.Л.Юркова<sup>1</sup>, В.К.Иванов<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *Институт физиологически активных веществ Российской академии наук,  
Лаборатория новых синтетических методов*

<sup>2</sup> *Институт общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова  
Российской академии наук*

## 1. Введение

*Легкие, как воздух, прочные, как сталь.* Именно такими уникальными свойствами обладают аэрогели — твердофазные материалы, получаемые методом сверхкритической сушки, структура которых представляет собой связную сетку из соединенных между собой наночастиц (2–5 нм) с огромным количеством чрезвычайно маленьких пор (100–10 нм). Фактически аэрогели на 95–99% состоят из воздуха, благодаря чему обладают практически самой малой плотностью среди твердых веществ (рекорд —  $2.9 \text{ кг} \cdot \text{м}^{-3}$ ), очень развитой поверхностью (более  $1000 \text{ м}^2 \cdot \text{г}^{-1}$ ), крайне низкой теплопроводностью (до  $0.004 \text{ Вт} \cdot \text{м}^{-1} \cdot \text{К}^{-1}$ ), т.е. много меньше, чем у воздуха ( $0.024 \text{ Вт} \cdot \text{м}^{-1} \cdot \text{К}^{-1}$ ) [1, 2]. Аэрогели являются самыми лучшими термоизоляторами в мире (слоя толщиной 2.5 см достаточно, чтобы защитить человеческую руку от прямого воздействия паяльной лампы), они практически сводят на нет все три способа теплообмена — конвекцию, теплопроводность и из-

лучение. Кроме этого, аэрогели характеризуются рядом других уникальных качеств: жаропрочностью (до  $2000^\circ\text{C}$  и выше), чрезвычайно низкой звуко- и электропроводностью, нередко — прозрачностью (показатель преломления до 1.03, окраска изменяется от голубой до темно-красной в зависимости от химического состава).

Аэрогели и материалы на их основе находят или могут найти применение в качестве:

— прозрачных или полупрозрачных тепло- и звукоизоляционных материалов (в частности, для производства стекол, композитов с волокнистыми материалами для получения прочных и гибких тканей, прокладок и покрытий для высокотемпературной и криогенной теплоизоляции);

— сверхлегких конструкционных материалов или добавок для модификации существующих конструкционных материалов;

— эффективных осушителей или сорбентов (например, для сбора нефти с поверхности воды, сорбции тяжелых металлов из растворов, эффективной осушки и/или молекулярной фильтрации газов);

— гетерогенных катализаторов и носителей катализаторов, сенсоров;

— рабочих тел в детекторах Черенкова, в ловушках элементарных частиц, космической пыли и т.п.;

— средств доставки лекарств;

— основы для создания суперконденсаторов;

— компонентов вооружений.

**С.А.Лермонтов.** Доктор химических наук, профессор, заведующий лабораторией новых синтетических методов ИФАВ РАН. e-mail: lermontov52@yandex.ru

**А.Н.Малкова.** Кандидат химических наук, старший научный сотрудник той же лаборатории. e-mail: alena\_ershova007@mail.ru

**Н.А.Сипягина.** Младший научный сотрудник той же лаборатории. e-mail: dolmatin\_89@mail.ru

**Л.Л.Юркова.** Кандидат химических наук, научный сотрудник той же лаборатории. e-mail: ludmilaush@mail.ru

**Е.А.Страумал.** Кандидат химических наук, младший научный сотрудник той же лаборатории. e-mail: lenochka.chg@gmail.com

**В.К.Иванов.** Доктор химических наук, профессор РАН, член-корреспондент РАН. e-mail: van@igic.ras.ru

† Работа впервые опубликована в книге «Наноматериалы: свойства и перспективные приложения». Под ред. А.Б.Ярославцева. Москва, Научный мир, 2014, 456 с. ISBN 978-5-91522-393-5

Основные препятствия для начала широкой эксплуатации аэрогелей — высокая стоимость и склонность к хрупкому разрушению. Стоит, однако, отметить, что удельная прочность аэрогелей (т.е. прочность, приведенная к массе) в разы превосходит прочность обычных конструкционных материалов, поэтому аэрогели могут найти применение в ракетной и авиационной технике.

## 2. Основы методов получения аэрогелей

Различия в свойствах аэрогелей обусловлены возможностью варьировать их химический состав и методику получения. Основные материалы для получения аэрогелей — это оксиды кремния, титана, алюминия, железа, олова, циркония, хрома и некоторых других элементов, например, лантаноидов. Активно проводятся исследования углеродных аэрогелей (пиролизированных композитов на основе углеродных волокон), органических аэрогелей (например, на основе агар-агара), аэрогелей, модифицированных другими элементами (для придания каталитических свойств, флуоресценции и т.п.), полимер-модифицированных аэрогелей и др.

Получение неорганических аэрогелей основано на золь-гель методе [2–5], в общем случае включающем в себя несколько стадий.

На первой стадии золь-гель синтеза происходит образование золя (коллоидного раствора) оксо- или гидроксо соединений металлов (в качестве исходного реагента может быть выбрана растворимая соль соответствующего металла или элементарно-органическое соединение) в результате реакций гидролиза прекурсоров.

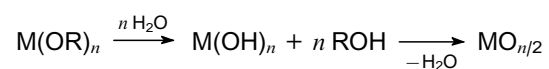
На второй стадии в результате поликонденсации продуктов гидролиза и формирования мостиковых связей  $M-OH-M$  и  $M-O-M$  (процессы оляции и оксоляции, соответственно) формируется трехмерный гель, заполняющий весь объем и называемый лиогель. Старение — процесс упрочнения каркаса геля — может включать в себя дальнейшую конденсацию, растворение, переосаждение частиц золя или фазовые переходы внутри твердой или жидкой фаз.

Третьей стадией синтеза аэрогелей является так называемая сверхкритическая сушка, в ходе которой жидкий компонент лиогеля удаляется из системы без нарушения структуры геля. Варьирование структуры и свойств получаемых аэро-

гелей может происходить за счет выбора состава и концентрации исходных металлосодержащих соединений, а также состава растворителя для сверхкритической сушки.

В качестве соединений-прекурсоров для получения неорганических аэрогелей используют некоторые соли, комплексы, алкоксиды, ацилаты и амины. Наиболее распространенными среди перечисленных прекурсоров являются алкоксиды, гидролиз которых легко и быстро протекает по схеме 1.

Схема 1



Для получения органических аэрогелей в качестве прекурсоров используют соединения, которые при полимеризации могут образовывать пространственно разветвленный каркас (сахара, резорцин-формальдегид и др.).

При обычной сушке капиллярное давление, возникающее в порах на границе раздела фаз [6], может достигать очень больших величин (выше 100 атм для пор размером  $\sim 10$  нм). По этой причине в процессе сушки гели имеют тенденцию разрушаться. В связи с этим, для получения аэрогелей, как правило, используется так называемая сушка в сверхкритических (СК) условиях, то есть удаление растворителя из геля при температуре, превышающей критическую температуру жидкости.

### 2.1 Сверхкритическая сушка

Жидкость в порах гелей зачастую имеет сложный состав и включает воду, продукты гидролиза (спирты), мономеры, олигомеры и т.д. Для сушки в сверхкритических условиях жидкость в порах заменяют на индивидуальный растворитель, обладающий меньшими критическими параметрами, чем вода ( $T_{кр} = 374.1^\circ\text{C}$ ,  $P_{кр} = 22.05$  МПа) и нагревают в закрытом автоклаве до температуры большей, чем его критическая температура. В качестве таких растворителей для сушки аэрогелей в настоящее время применяют, главным образом,  $\text{CO}_2$  и низшие спирты. В табл. 1 приведены критические параметры для некоторых растворителей.

При превышении критических температуры и давления растворитель переходит в сверхкритическое состояние, что приводит к исчезнове-

**Таблица 1.** Критические параметры растворителей, применяемых для сверхкритической сушки.

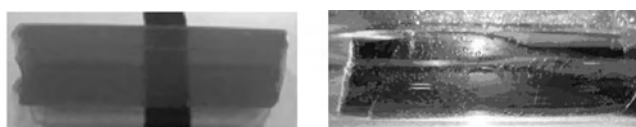
Растворитель	$T_{кр}, ^\circ\text{C}$	$P_{кр}, \text{МПа}$
$\text{CO}_2$	31.0	7.38
Вода	374.1	22.05
Метиловый спирт	239.4	8.10
Этиловый спирт	243.0	6.38
Изопропиловый спирт	235.1	4.76

нию поверхностного натяжения и, соответственно, капиллярных сил. По достижении заданной температуры сверхкритический флюид (СКФ) выпускают из нагретого автоклава, снижая давление до атмосферного, после чего охлаждают автоклав до комнатной температуры.

Влияние растворителя на состав аэрогелей на данный момент мало изучено, соответствующие работы практически отсутствуют [7–11]. Известно только, что замена  $\text{CO}_2$  на спирты приводит к алкилированию поверхности аэрогелей вследствие взаимодействия спирта с поверхностными гидроксильными группами. В результате поверхность аэрогелей становится более гидрофобной.

Данные о влиянии состава растворителя, применяемого для СК сушки, на площадь поверхности и пористость аэрогелей в литературе на настоящий момент также фрагментарны. Проведенный нами сравнительный анализ характеристик аэрогелей  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{ZrO}_2$ , полученных СК сушкой в среде простых эфиров и фторированных спиртов, показал, что состав и величина удельной поверхности получаемых аэрогелей самым существенным образом зависят от применяемого СКФ [12].

В настоящее время в ИФАВ РАН и ИОНХ РАН ведутся работы по получению аэрогелей на

**Рис. 1.** Аэрогели на основе  $\text{SiO}_2$ .

основе оксидов кремния, титана, циркония, алюминия и олова из алкоксидов и солей соответствующих металлов. Плотность получаемых аэрогелей достигает  $40 \text{ кг} \cdot \text{м}^{-3}$ , а площадь поверхности превышает  $1000 \text{ м}^2 \cdot \text{г}^{-1}$ . На рис. 1 в качестве иллюстрации приведены фотографии аэрогелей на основе  $\text{SiO}_2$ , полученные авторами.

## 2.2. Сушка при атмосферном давлении

Сушка в СК условиях позволяет избежать образования менисков жидкости в порах и действия капиллярных сил. В то же время, ограниченное применение находит и сушка при атмосферном давлении [4].

На поверхности оксидного геля, как правило, присутствуют гидроксильные группы (в случае оксида кремния это полярные силанольные группы  $\text{Si}-\text{OH}$ ), что приводит к хорошему смачиванию поверхности водой и спиртами. Для увеличения угла смачивания применяют химическую модификацию поверхности гелей реагентами, замещающими протоны на, например, триалкилсилильную группу [2, 4], что в некоторых случаях позволяет высушивать их при атмосферном давлении без разрушения структуры. Методы химической модификации поверхности будут рассмотрены подробнее в разделе, посвященном аэрогелям на основе  $\text{SiO}_2$ .

## 3. Типы аэрогелей

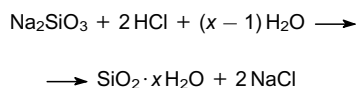
Неорганические аэрогели известны с 1931 г. [13]. Наиболее изученными среди неорганических аэрогелей являются АГ на основе диоксида кремния. Кроме того, получены аэрогели на основе оксидов алюминия, титана, железа, олова, циркония и других элементов, а также АГ на основе смешанных оксидов, углеродные АГ, композитные АГ и др.

### 3.1. $\text{SiO}_2$

Аэрогели  $\text{SiO}_2$  аморфны, плотность каркаса ( $\sim 2 \text{ г} \cdot \text{см}^{-3}$ ) близка к плотности аморфного  $\text{SiO}_2$  ( $2.2 \text{ г/см}^3$ ), объем пор обычно составляет около 90% от общего объема материала [14]. Аэрогели  $\text{SiO}_2$  являются, как правило, мезопористыми материалами со средним диаметром пор от 20 до 40 нм. Их удельная поверхность достаточно велика и в отдельных случаях может превышать  $1000 \text{ м}^2 \cdot \text{г}^{-1}$  [15].

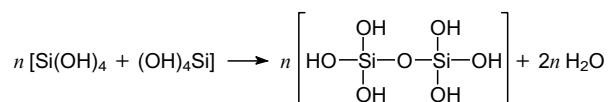
### 3.2. Получение гелей из водорастворимых силикатов

Метасиликат натрия  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  (жидкое стекло) является самым дешевым источником кремниевой кислоты, из которого может быть получен гель  $\text{SiO}_2$  [3, 4, 16, 17].  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  реагирует с водой в присутствии кислоты в соответствии с реакциями типа



Кремниевая кислота конденсируется с образованием мономерных частиц гидратированного диоксида кремния, объединяющихся в цепочки и, в конечном счете, формирующих каркас  $\text{SiO}_2$  (схема 2).

Схема 2



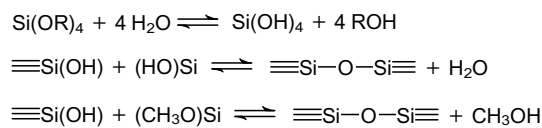
Основной проблемой, связанной с использованием метасиликата натрия в качестве прекурсора, является необходимость длительного диализа для удаления посторонних ионов из гидрогеля.

Описано получение гелей  $\text{SiO}_2$  с использованием в качестве прекурсоров алюмосиликатов, силикатов кальция и т. д. [18, 19]. Известны также работы по получению аэрогелей  $\text{SiO}_2$  на основе такого сельскохозяйственного отхода, как рисовая шелуха — недорогого источника чистого кремнезема [20, 21].

Основным классом прекурсоров, используемых для синтеза гелей  $\text{SiO}_2$ , являются алкоксиды кремния типа  $\text{R}_n\text{Si}(\text{OR})_{4-n}$ , в которых R и R' — алкильные группы [2–4]. Такими прекурсорами являются тетраметоксисилан [22], тетраэтоксисилан [23], полиэтоксидисилоксан [24, 25], метилтриметоксисилан [26, 27], метилтриэтоксисилан [28], 3-(2-аминоэтиламино)пропилтриметоксисилан [29], *n*-октилтриэтоксисилан [30] и диметилдиэтоксисилан [31]. Все эти прекурсоры характеризуются наличием ковалентных связей Si—O в молекулах.

Полимеризацию алкоксидов проводят в органических растворителях путем одновремен-

Схема 3



ного гидролиза и поликонденсации с выделением воды и спирта (схема 3).

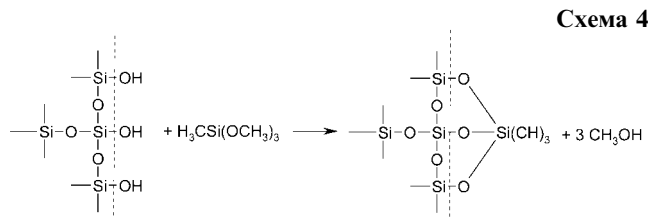
Механизм гидролиза включает нуклеофильную атаку воды на атом кремния [32]. В связи с поляризованностью связей Si—O атомы кремния имеют умеренный частичный положительный заряд ( $\delta^+ \approx 0.32$  в  $\text{Si}(\text{OEt})_4$  [32]), который определяет скорость нуклеофильной атаки и, следовательно, скорость общей реакции гидролиза. Реакции гидролиза алкоксидов кремния и конденсации протекают очень медленно, для их ускорения процессов требуется применение основного или кислотного катализа. В литературе описано применение широкого спектра кислотных катализаторов, в том числе HCl, HF и карбоновых кислот. Наиболее часто используемым основным катализатором является водный раствор аммиака  $\text{NH}_3$ , в качестве оснований Льюиса иногда также применяют NaF или  $\text{NH}_4\text{F}$ .

### 3.3. Модификация поверхности

Термины «гидрофильность» и «гидрофобность» описывают взаимодействие между поверхностью вещества и водой. В случае гидрофильной поверхности угол смачивания  $\theta < 90^\circ$ , в случае гидрофобной  $\theta > 90^\circ$ . Гидрофильность/гидрофобность зависят от присутствующих на поверхности АГ групп. Группы Si—OH на поверхности аэрогелей  $\text{SiO}_2$  придают ей гидрофильные свойства. Замещение групп Si—OH на гидролитически стабильные неполярные гидрофобные группы Si-R или Si-OR приводит к образованию устойчивых к действию влаги гидрофобных аэрогелей.

Для химической модификации поверхности аэрогелей на основе диоксида кремния с целью придания им гидрофобных свойств применяют два основных подхода. Первый подход заключается в использовании гидрофобных кремний-содержащих прекурсоров, имеющих как минимум одну неполярную группу, связанную с атомом кремния [2, 33–39 и др.]. Так, в случае синтеза гелей совместным гидролизом метилтри-

метоксисилана и тетраметилортосиликата процесс гелеобразования протекает по квази-двухступенчатому механизму. В связи с тем, что скорость гидролиза и конденсации метилтриметоксисилана гораздо ниже, чем у тетраметилортосиликата, сначала гидролизует тетраметилортосиликат, а затем метилтриметоксисилан прививается на поверхности геля через силанольные группы с образованием групп  $\text{Si}-\text{O}-\text{Si}-\text{CH}_3$  на поверхности. Гидрофобизацию аэрогеля диоксида кремния при синтезе с метилтриметоксисиланом можно свести к следующей реакции (схема 4).



При соотношении метилтриметоксисилан/тетраметилортосиликат, равном 0,7, формируются материалы с хорошими гидрофобными свойствами [36]. Аналогичные результаты были получены при совместном гелеобразовании с использованием в качестве прекурсоров тетраметилортосиликата и метилтриэтоксисилана [40].

Метильные группы в метилтриметоксисилане могут быть заменены другими функциональными группами, например, фторалкильными [41–43], арильными [44] и т.д.

Второй способ придания аэрогелям гидрофобных свойств заключается в модификации поверхности уже полученных гелей. С этой целью применяют два подхода, первый из которых заключается в силилировании поверхности с образованием групп  $\text{Si}-\text{O}-\text{Si}$  вместо  $\text{SiOH}$ . Обычно силилирование проводят с применением гексаметилдисилазана [40, 45–49], алкилхлорсиланов [47, 50–52] и других кремнийорганических соединений [53]. Используя этот подход, можно получать порошки гидрофобных аэрогелей  $\text{SiO}_2$  с контактным углом  $150^\circ$ , очень низкой плотностью ( $0.08 \text{ г} \cdot \text{см}^{-3}$ ), высокой удельной поверхностью ( $\sim 800 \text{ м}^2 \cdot \text{г}^{-1}$ ) и объемом пор, равным  $\sim 2.3 \text{ см}^3 \cdot \text{г}^{-1}$  [54]. Второй подход к модификации аэрогелей заключается в алкоксилровании поверхности спиртами при высокой температуре, при этом происходит замена групп  $\text{SiOH}$  на группы  $\text{SiOR}$ . В частности, известно, что

метоксилирование поверхности гелей на основе  $\text{SiO}_2$  происходит при обработке метиловым спиртом в газовой фазе при  $220-240^\circ\text{C}$  [55–57]. В работах [7, 8] также высказано предположение о том, что при СК сушке такие растворители, как метанол, этанол, 2-пропанол, изобутанол и 2-пентанол реагируют с поверхностью диоксида кремния с образованием соответствующих алкоксипроизводных.

### 3.4. $\text{Al}_2\text{O}_3$

Оксид алюминия с высокой удельной поверхностью широко применяется в составе катализаторов и носителей для катализаторов, в качестве адсорбента и т.д. [58, 59]. Кроме того, микро- и нанокристаллический оксид алюминия используется как прекурсор для получения керамики на основе  $\text{Al}_2\text{O}_3$ .

Наиболее распространенный способ получения гелей на основе гидроксосоединений алюминия заключается в гидролизе алкоголятов (изопропоксида или *втор*-бутоксида) алюминия в избытке воды в присутствии кислотного катализатора [60–63]. Гидролиз *втор*-бутоксида алюминия может проводиться также в различных органических растворителях, таких как бензол и спирты [59, 64–66].

Сравнительно недавно был предложен новый подход к получению аэрогелей на основе оксидов металлов, в частности,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ . В этом методе, обычно называемом эпоксидно-иницируемое гелеобразование, используются органические эпоксиды в качестве инициаторов золь-гель полимеризации неорганических соединений металлов в водных или спиртовых средах [58, 67–74]. Эпоксиды (например, окись пропилена) действуют как акцепторы кислоты, регулируя скорости гидролиза и поликонденсации гидратированных ионов металлов. Одним из преимуществ этого метода является возможность использования доступных солей металлов (например, нитратов или галогенидов) в качестве прекурсоров в золь-гель процессе. Метод позволяет получать аэрогели на основе металлов основных групп, переходных и редкоземельных металлов, смешанные и композитные АГ, а также контролировать микроструктуру гелей за счет варьирования параметров синтеза.

В работе [58] рассмотрен эпоксидный метод получения аэрогелей оксида алюминия, обла-

дающих высокой удельной поверхностью и низкой плотностью. В качестве прекурсоров использовали гидраты солей алюминия —  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ . Авторы отмечают, что текстурные характеристики таких аэрогелей выгодно отличаются от свойств аэрогелей  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , полученных с использованием алкоксидных прекурсоров. Одним из интересных аспектов этой работы является то, что состав используемой в золь-гель реакции соли значительно сказывается на структурных и механических свойствах получаемых аэрогелей.

В работе [75] получены композиционные ксеро- и аэрогели  $\text{ZnO}/\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{CuO}/\text{Al}_2\text{O}_3$  и  $\text{CuO}/\text{ZnO}/\text{Al}_2\text{O}_3$  с использованием окиси пропилена в качестве гелирующего агента в этаноле.

Описано получение композиционных аэрогелей  $\text{SiO}_2-\text{Al}_2\text{O}_3$  [76, 77],  $\text{Ni}-\text{Al}_2\text{O}_3$  [78],  $\text{NiO}-\text{Al}_2\text{O}_3$  [79], а также смешанных органо-неорганических аэрогелей на основе  $\text{Al}_2\text{O}_3$  [80] совместным гидролизом алкоксида алюминия и гексаметилендиизоцианата.

### 3.5. $\text{ZrO}_2$

Аэрогель  $\text{ZrO}_2$  в основном получают с использованием ацетилацетоната [81], тетрабутоксидом [82] или тетраизопропоксида циркония [83–87] в качестве прекурсоров с применением азотной, серной или уксусной кислот как катализаторов гидролиза. В качестве исходных соединений для синтеза аэрогелей  $\text{ZrO}_2$  можно также использовать оксинитрат циркония [88] и оксихлорид циркония [89], проводя гелеобразование с помощью эпоксидов [90].

### 3.6. $\text{TiO}_2$

Аэрогель  $\text{TiO}_2$  получают с использованием в качестве прекурсоров тетрабутоксидом, тетраэтоксидом или тетраизопропоксида титана с применением кислот [91–95] или эпоксидов [96] как инициаторов золь-гель процесса.

Описано получение различных смешанных и композитных аэрогелей:  $\text{SiO}_2-\text{TiO}_2$  [76, 97, 98],  $\text{Au}-\text{TiO}_2$  [99],  $\text{Zn}_x\text{Ti}_{1-x}\text{O}_{2-x}$  [100] и др.

### 3.7. Неорганические аэрогели на основе соединений других элементов

Известно огромное множество неорганических аэрогелей на основе индивидуальных оксидов — аэрогели  $\text{SnO}_2$  [101],  $\text{MgO}$  [102],  $\text{ZnO}$  [103],  $\text{Fe}_2\text{O}_3$

[67, 68, 104], аэрогели на основе оксидов переходных металлов (хрома, гафния, ниобия, тантала, вольфрама, галлия, индия) [90], а также рутения [105], меди и цинка [106, 107], никеля и кобальта [108–110], оксидов f-элементов [111, 112] (оксидов церия [113], тория и урана [114, 115]) и др. Известны также материалы более сложного состава — аэрогели  $\text{SiO}_2-\text{Fe}_2\text{O}_3$  [116–118],  $\text{ZrO}_2-\text{Y}_2\text{O}_3$  [119], легированного стронцием манганита лантана [120], сложных оксидов металлов со структурой шпинели (таких как  $\text{ZnFe}_2\text{O}_4$  и  $\text{CoAl}_2\text{O}_4$ ) [121, 122],  $\text{Al}_2\text{O}_3-\text{CuO}-\text{ZnO}$  [123] и др.

### 3.8. Органические и углеродные аэрогели

Органические аэрогели — это класс монолитных аэрогелей с прочными ковалентными C–C, C–N и C–O связями, каркас которых построен на основе органических полимеров, причем свойства АГ зависят от характеристик полимера. Как правило, органические аэрогели обладают свойствами, существенно отличающимися от свойств неорганических аэрогелей. Они менее рыхлые и менее хрупкие, не рассыпаются в порошок при деформации. Структура органических аэрогелей существенно зависит от прекурсоров, растворителей и природы катализаторов, участвующих в золь-гель реакции [124, 125]. Пиролиз органических АГ при температурах выше  $500^\circ\text{C}$  приводит к получению так называемых углеродных аэрогелей.

Среди органических аэрогелей наиболее изучены резорцин-формальдегидные (РФ), которые получают поликонденсацией резорцина с формальдегидом [126–134 и др.] (схема 5).

Среди органических аэрогелей также хорошо изучены меламина-формальдегидные (МФ), которые получают поликонденсацией меламина с формальдегидом [135–137] (схема 6).

Реакции конденсации обычно проводят в слабощелочных растворах, в качестве катализаторов гелеобразования часто применяют гидроксид или гидрокарбонат натрия. Иногда также используют кислотный или кислотно-основный катализ [138].

Как и в случае с  $\text{SiO}_2$ , сначала образуются небольшие кластеры с размером около 2 нм, состоящие из разветвленных полимерных молекул. Эти кластеры агрегируют с образованием частиц размером 4–7 нм, который на послед-

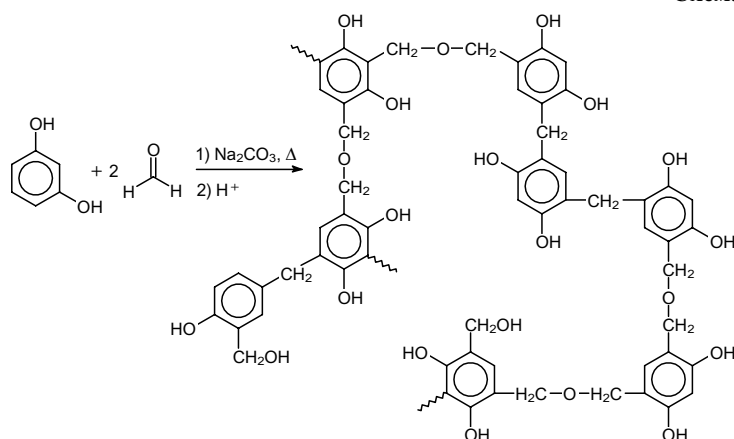


Схема 5

Их можно превратить в сильно сшитые полиуретановые, полимочевинные, полиуретан-иминные или полиизоциануратные аэрогели, которые могут выступать в качестве перспективных теплоизоляционных материалов с хорошими функциональными характеристиками. При использовании полиуретановых прекурсоров удельная поверхность полученных АГ составляет около  $300 \text{ м}^2 \cdot \text{г}^{-1}$ , плотность —  $0.24 \text{ г} \cdot \text{см}^{-3}$  [143].

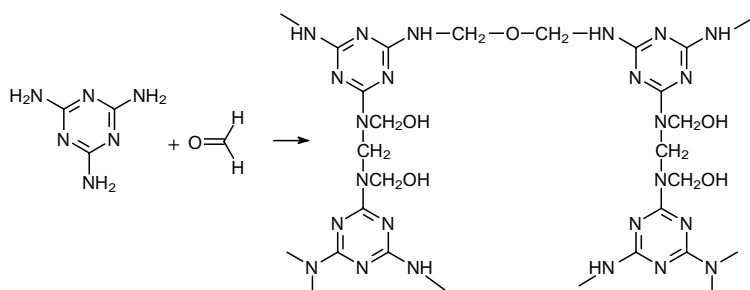


Схема 6

Еще одной большой группой органических аэрогелей являются АГ на основе полисахаридов (альгинат, альгиновая кислота,  $\kappa$ -каррагинан, агар, хитин, хитозан, крахмал, танин и др.) [144–151 и др.]. Указанные полисахариды являются важными компонентами в пищевой, косметической, фармацевтической и других отраслях промышленности. Благодаря таким свойствам, как биоразлагаемость и биосовместимость,

аэрогели на основе полисахаридов являются также перспективными носителями для систем доставки лекарств. Работ, посвященных синтезу АГ на основе полисахаридов, достаточно много.

Описано получение упорядоченных макропористых резорцин-формальдегидных аэрогелей с использованием коллоидных частиц полистирола в качестве темплатов [152], высокопористых синдиотактических полистирольных аэрогелей с использованием азулена [153, 154], целлюлозных нановолокон [155] и бактериальной целлюлозы [156]. Для получения органических аэрогелей можно также использовать такие прекурсоры,

ующей стадии гелеобразования остается неизменным. Полученные после сверхкритической сушки с использованием  $\text{CO}_2$  материалы содержат мезо- и микропоры [139].

В условиях основного катализа плотность полученных материалов достаточно высока ( $0.4\text{--}0.9 \text{ г} \cdot \text{см}^{-3}$ ), тогда как в условиях кислотного или двойного кислотно-основного катализа могут быть получены РФ аэрогели с очень низкой плотностью ( $\sim 0.01 \text{ г} \cdot \text{см}^{-3}$ ) [138].

Органические аэрогели с низкой плотностью могут быть получены также полимеризацией фенола с формальдегидом в присутствии основного катализатора ( $\text{NaOH}$ ) с последующей СК сушкой в этаноле [140] (схема 7).

В работе [141] впервые описано получение высокопористых органических аэрогелей из смешанной лигнин-фенол-формальдегидной смолы. Было показано, что полученные материалы обладают очень низкой теплопроводностью, а распределение пор по размерам сильно зависит от исходного состава смеси.

С точки зрения практического применения наиболее интересными представляются полимерные гели на основе полиизоцианатов [142].

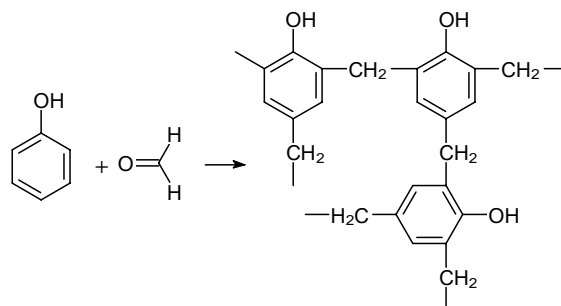


Схема 7



как фенольно-фурфурольные смеси с полидиметилсилоксаном в качестве стабилизатора [128, 157], полиэтоксидисилоксаны [158], полидиметилсилоксан [159], 2,3-додецилоксиантрацен [160], поливинилхлорид [161], полисилоксаны с ариленовыми мостиками [162], поливиниловый спирт, полиэфиры, полиакриламиды и полиметакриламиды, полиамиды, полиимиды, эпоксидные полимеры, полиолефины, полистиролы, полифурфурол и различные сочетания перечисленных прекурсоров [137, 163 и др.].

Углеродные аэрогели обычно получают пиролизом органических аэрогелей при температуре выше  $500^{\circ}\text{C}$  [131], при этом образуется электропроводящий углеродный каркас. После пиролиза углеродные аэрогели сохраняют высокие удельную площадь поверхности ( $400\text{--}800\text{ м}^2\cdot\text{г}^{-1}$ ) и удельный объем мезопор ( $>0.55\text{ см}^3\cdot\text{г}^{-1}$ ) [139, 164]. Наибольшая удельная поверхность достигается при обработке при температуре около  $600^{\circ}\text{C}$ . Обычно высокая микропористость развивается при пиролизе при температурах ниже  $1000^{\circ}\text{C}$  [165, 165], однако в целом пористость аэрогелей сохраняется даже после пиролиза при  $1800^{\circ}\text{C}$  [167, 168].

Микропористость углеродных аэрогелей может быть увеличена за счет введения в исходные органические аэрогели соединений церия или циркония. С использованием этих добавок была достигнута высокая удельная поверхность ( $>2200\text{ м}^2\cdot\text{г}^{-1}$ ) [169, 170]; в присутствии этих добавок также наблюдалась повышенная графитизация образцов при температурах выше  $1000^{\circ}\text{C}$  [167, 168].

Стандартным исходным соединением для получения углеродных аэрогелей является резорцин-формальдегидный полимер, получаемый в условиях кислотного [171, 172], основного или двойного кислотно-основного катализа [173]. Кроме того, углеродные аэрогели были получены пиролизом продуктов поликонденсации смеси крезолов и формальдегида в водном щелочном растворе [174, 175]; поликонденсации резорцина и фурфурола с использованием в качестве катализаторов гексаметилентетрамина [176, 177] или органических кислот [178–180]; полимеризации фенола с формальдегидом [140] или фенола с фурфуролом [181] в присутствии основного катализатора (NaOH); полимеризации резорцина с формальдегидом с использованием

коллоидных частиц полистирола в качестве темплатов [152]; из смеси флороглюцин–фенол [182]; из карбамидо-разветвленных фенол-резорцин-формальдегидных смол [183]; из 2,4-дигидроксибензойной кислоты и формальдегида [184, 185]; из аэрогелей на основе крахмала [186].

Углеродные аэрогели со сверхвысоким объемом пор были получены при добавлении структурообразующих наночастиц диоксида кремния к резорцин-формальдегидным золям, что резко снизило усадку и разрушение структуры при СК сушке и пиролизе [187]. Полученные углеродные аэрогели обладали очень низкой плотностью и значительным объемом пор. При изменении массового соотношения наночастиц  $\text{SiO}_2$  и резорцин-формальдегидной смолы оказалось возможным варьировать объем пор углеродных аэрогелей в диапазоне  $2.8\text{--}6.0\text{ см}^3\cdot\text{г}^{-1}$ .

Описано получение углеродных аэрогелей на основе ацетата целлюлозы с азотными или кислородными функциональными группами [188] и с нанесенными наночастицами платины [189]. Полимеризация танина с формальдегидом в широком диапазоне pH с последующим пиролизом позволяет значительно снизить стоимость углеродных аэрогелей и получать пористые углеродные материалы, содержащие от 57% до 78% мезопор, с площадью поверхности  $>700\text{ м}^2\cdot\text{г}^{-1}$  и пористостью до 95% [115]. Объем пор и распределение микро- и мезопор по размерам в танин-формальдегидных аэрогелях аналогичны более дорогим углеродным аэрогелям на основе резорцин-формальдегидных смол.

Органические тиофен-модифицированные резорцин-формальдегидные аэрогели могут быть получены при взаимодействии частично отвержденных резорцин-формальдегидных гелей с 3-тиофенкарбоксальдегидом [190]. Гетероциклическая сера сохраняется в аэрогелях даже после пиролитической конверсии полимерных аэрогелей в проводящую углеродную форму. Содержащие серу углеродные АГ способны сорбировать коллоидные частицы платины из водных суспензий. Подобные функционализированные углеродные аэрогели могут найти применение в топливных элементах и других электрокаталитических приложениях. Определенный интерес представляет и использование углеродных аэрогелей в суперконденсаторах [191, 192].

### 3.9. Композитные аэрогели

Прочностные характеристики аэрогелей могут быть значительно улучшены при включении в их состав полимеров. В зависимости от химической связи между полимером и каркасом  $\text{SiO}_2$  такие аэрогели можно разделить на два типа [193].

Аэрогели первого типа называются взаимопроницающими. В них полимер и неорганический каркас практически независимы, ковалентные связи между ними отсутствуют; взаимодействие происходит только через силы Ван-дер-Ваальса, электростатические силы или водородные связи. Мономеры могут быть введены в поры погружением геля в мономер; также они могут быть включены в золь при гелеобразовании. В последнем случае процессы гелеобразования и полимеризации должны протекать независимо, а соответствующие реагенты не должны реагировать друг с другом. Поскольку процесс получения аэрогеля обычно включает промывку (замену растворителя), основная проблема при получении взаимопроницающих аэрогелей состоит в вымывании полимера из пор во время обработки. Для получения АГ этого типа используют такие полимеры как полиметилметакрилат, поли-2-винилпиридин, полиметилметакрилат-со-(3-триметоксисилил)пропилметакрилат, полидиметилсилоксан, полиакриламид, полиакрилонитрил, метилцианоакрилат [194–200]. Взаимопроницающие аэрогели на основе оксидов Fe, Co, Ni, Sn, Cu, Cr, Ti, Hf, Y и Dy используют для получения металлических катализаторов на носителях, а также для получения карбидных АГ [2].

Второй тип полимерных АГ — так называемые X-аэрогели. Они представляют собой композиционные органо-неорганические материалы, состоящие из оксидных или металлических наночастиц, скрепленных между собой полимерными мостиками. В таких аэрогелях полимерная и неорганическая части связаны ковалентно, поверхность частиц покрыта ковалентно связанными органическими группами. Аэрогели этого типа известны не только для  $\text{SiO}_2$ , но и для оксидов ванадия [201], алюминия [202], редкоземельных металлов [203], циркония и олова [204]. В качестве полимерных связующих применяют полиизоцианаты (образуются мостики из полимочевины), полиуретаны, метилцианоакрилат, полиэферы, полиэпоксиды, поли-

стиролы, полиакрилаты и др. [202, 205–212]. Описано получение amino-модифицированных гелей  $\text{SiO}_2$  совместным гелированием тетраметилортосиликата и аминопропилтриэтоксисилана (APTES) [213]. Поскольку аминогруппа является универсальной функциональной группой, такие гели сшиваются не только полифункциональными изоцианатами, но также эпоксидами [214], и даже полистиролом [215].

В отличие от обычных аэрогелей, X-аэрогели могут быть не только жесткими, но и гибкими или мягкими, гидрофобными или гидрофильными материалами, их прочность на сжатие зачастую на 2 порядка выше, чем прочность неорганических аэрогелей, при этом пористость, теплопроводность и плотность меняются незначительно. Возможность регулирования соотношения полимер-оксид, выбора полимеров различной природы позволяет получать аэрогели с заданными свойствами.

## 4. Применение аэрогелей

Благодаря наличию прочного каркаса и высокой пористости, аэрогели обладают уникальными оптическими, термоизоляционными, звукоизоляционными и механическими свойствами, что позволяет использовать их в разных отраслях науки и техники. Наиболее важными областями применения аэрогелей являются различные виды теплоизоляции, однако перечень применений аэрогелей этим далеко не ограничивается. В табл. 2 приведены перспективные области применения материалов на основе аэрогелей.

Рассмотрим некоторые области применения АГ более подробно.

### 4.1. Аэрогели как тепло- и акустические изоляторы

Аэрогели являются одними из самых эффективных теплоизоляционных материалов (1–10% от теплопроводности соответствующего компактного материала) [2–4]. Очень низкая теплопроводность является одним из самых привлекательных свойств АГ. АГ состоят из наночастиц, связанных в ажурный трехмерный каркас, содержащий большое количество закрытых каналов, что препятствует теплообмену.

Аэрогели на основе  $\text{SiO}_2$  могут применяться и уже применяются для теплоизоляции систем охлаждения или отопления, включая трубопро-

**Таблица 2.** Некоторые свойства АГ и области их применения.

Свойство	Особенность	Применение
Теплопроводность	Лучшие теплоизоляционные материалы Термостойкость Малая плотность	Строительные конструкции и теплоизоляция Автомобили, аэрокосмические аппараты Трубопроводы, криотехника, переносные холодильники
Плотность/Пористость	Самые легкие синтетические твердые вещества Большая площадь поверхности Разнообразие химического состава	Катализ Сенсоры Хранение топлива Ионный обмен Газовые фильтры
Оптические свойства	Прозрачность Низкий показатель преломления Разнообразие химического состава	Легкая оптика Детекторы Черенкова Световоды Специальная оптика
Акустические свойства	Низкая скорость звука	Звукоизоляция
Механические свойства	Эластичность Малая плотность	Поглотители энергии Ловушки частиц, имеющих сверхзвуковую скорость
Электрические свойства	Высокая диэлектрическая прочность Большая площадь поверхности	Изоляторы Конденсаторы

воды, в тепло- и холодо-сохраняющем оборудовании, на транспорте (теплоизоляция в авиации, космонавтике, автомобилестроении, железнодорожном транспорте), в бытовой технике (бытовые и переносные холодильники, теплоизоляция жилищ) [216–218].

Примерно с 2000 г. началось коммерческое производство аэрогельных одеял. Такое одеяло состоит из упрочненного волокном аэрогеля  $\text{SiO}_2$ . Механические и термические свойства изделия зависят от характеристик армирующих волокон, матрицы аэрогеля и добавок, включенных в состав такого композита. Альпинисты используют аналогичные аэрогельные стельки, а также спальные мешки.

Перспективными теплоизоляционными материалами являются более прочные органические аэрогели, которые имеют теплопроводность того же порядка, что и аэрогели на основе диоксида кремния [219]. Они рассматриваются как новые теплоизоляционные материалы для применения в промышленности [220].

В связи с тем что аэрогели  $\text{SiO}_2$  негорючи и обладают высоким светопропусканием, они рассматриваются как перспективный материал для теплоизоляции оконных стекол. При нанесении АГ  $\text{SiO}_2$  стекло пропускает видимое и ультра-

фиолетовое излучение, но задерживает инфракрасное излучение [221, 222]. Для широкого применения аэрогелей  $\text{SiO}_2$  в качестве прозрачных теплоизоляторов необходимо улучшать их механические свойства без существенного ухудшения основных оптических свойств. Прочность аэрогелей  $\text{SiO}_2$  может быть значительно повышена путем добавления органического связующего, например, поливинилбутирата [223], при этом теплопроводность получаемых материалов составляет менее  $20 \text{ мВт} \cdot \text{м}^{-1} \cdot \text{К}^{-1}$  при комнатной температуре [224].

Аэрогели являются превосходными акустическими изоляторами. Распространение звука в аэрогелях определяется их текстурой [225, 226]. Аэрогели на основе диоксида кремния являются перспективными материалами для создания звукоизолирующих напольных покрытий [223], для звукоизоляции в транспорте и технике, а также в динамиках и наушниках [227, 228].

#### 4.2. Оптические применения аэрогелей

Аэрогели на основе диоксида кремния с низкими показателями преломления являются удобным материалом для счетчиков Черенкова [4, 229], которые используются для идентификации электрически заряженных частиц в физике высо-

ких энергий. Применение аэрогелей для обнаружения частиц на основе эффекта Черенкова было впервые описано еще в начале 1980-х годов.

Благодаря тому что показатель преломления аэрогелей  $\text{SiO}_2$  близок к показателю преломления воздуха, эти АГ применяют в качестве покрытия для оптических волокон. Толщина слоя АГ, как правило, составляет около 20 мкм. Кроме того, прозрачные аэрогели предлагается использовать в солнечной энергетике [230, 231].

Аэрогели используются для получения сверхчистого плотного кварцевого стекла путем спекания при температурах ниже температуры плавления оксида кремния [232]. Аэрогель на основе двуоксида кремния, легированный радиоактивными изотопами, является эффективным радиолюминесцентным источником света [233].

#### 4.3. Аэрогели в качестве сорбентов и наполнителей

Высокодисперсные частицы аэрогелей могут быть использованы в качестве наполнителей для других материалов, например, красок, лаков и эластомеров, для придания им твердости, устойчивости к износу, а также модификации некоторых других характеристик. В сельском хозяйстве частицы аэрогелей могут использоваться как средства дозированной подачи таких разнообразных веществ, как фунгициды, гербициды, пестициды. Механически прочные, частично спеченные аэрогели пригодны для хранения или транспортировки жидкостей, например, ракетных топлив, таких как дымящая азотная кислота и несимметричный 1,1-диметилгидразин [234, 235].

Аэрогели можно использовать в качестве компонентов энергетических материалов; представляют интерес композиты аэрогелей и взрывчатых веществ, а также аэрогели, содержащие одновременно и окислитель, и восстановитель [229, 236, 237].

Аэрогели на основе диоксида кремния, оксида алюминия, а также углеродные аэрогели, пропитанные  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{LiBr}$  и  $\text{MgCl}_2$ , исследовались в качестве сорбентов с целью создания термоаккумуляторов [238]. Было показано, что энергоемкость этих материалов намного выше, чем у традиционно используемых.

Углеродные аэрогели были использованы для производства суперконденсаторов [239–241].

Гидрофобные углеродные аэрогели и аэрогели  $\text{SiO}_2$  использовали в качестве адсорбентов для бензола, толуола, ксилолов и масел [242–244]. Также аэрогели используют для адсорбции или извлечения некоторых химических компонентов, например, для очистки сточных вод, удаления радиоактивных отходов [229] и фильтрации газов [245].

#### 4.4. Аэрогели как сенсоры

Благодаря высокой пористости, доступности пор и высокой активности поверхностных центров, АГ являются перспективными материалами для использования в качестве сенсоров/чувствительных элементов. В работе [246] были получены тонкие пленки аэрогелей на основе оксида кремния и показано, что их электрическое сопротивление заметно уменьшается с увеличением влажности. В отличие от аэрогелей, аналогичные ксерогели имели очень низкую сенсорную чувствительность. Аэрогели с модифицированной гидрофобной поверхностью менее чувствительны к влажности по сравнению с гидрофильными аэрогелями и могут быть использованы в качестве антикоррозионных гидрофобных агентов [247].

#### 4.5. Аэрогели как катализаторы

Большая площадь поверхности и высокая пористость аэрогелей позволяет применять их в качестве катализаторов или носителей катализаторов [248–252]. Известны такие каталитические реакции с использованием аэрогелей, как селективное окисление на  $\text{NiO}-\text{Al}_2\text{O}_3$  и  $\text{NiO}-\text{SiO}_2-\text{Al}_2\text{O}_3$  [248, 253, 254], селективное восстановление на  $\text{Fe}_2\text{O}_3-\text{Cr}_2\text{O}_3-\text{Al}_2\text{O}_3$  [255], полимеризация с использованием катализаторов Циглера–Натта ( $\text{TiCl}_4-\text{Al}_2\text{O}_3$ ) [256], селективное гидрирование (реакция Фишера–Тропша) на  $\text{Fe}_2\text{O}_3-\text{SiO}_2$  и  $\text{Fe}_2\text{O}_3-\text{Al}_2\text{O}_3$  [257], синтез нитрилов из углеводородов, например, превращение изобутена в метакрилонитрил по реакции с  $\text{NO}$  на аэрогеле оксида цинка [258, 259], синтез метанола из  $\text{CO}$  с использованием аэрогеля медь/оксид циркония [260] и др.

Аэрогели могут использоваться в экологических приложениях, в частности, для сокращения содержания токсичных веществ в выхлопных газах автомобилей. Так, известны работы по

полному сжиганию метана на аэрогелях на основе алюмината  $BaAl_{12}O_{19}$ , допированных Mn, Cr, Fe, Ni или Co [261 – 263].

Интересные результаты в этой области касаются биокатализаторов, полученных инкапсуляцией ферментов в аэрогели  $SiO_2$ . В работах [264, 265] в реакции переэтерификации лауриновой кислоты 1-октанолом в качестве биокатализаторов использовали ксерогели и аэрогели на основе  $SiO_2$  и  $Al_2O_3-SiO_2$ , в которые была инкапсулирована липаза, причем было показано, что катализаторы на основе аэрогелей обладают более высокой активностью, чем катализаторы на основе ксерогелей.

#### 4.6. Аэрогели в медицине

Аэрогели используют как системы доставки лекарственных препаратов (DDS — drug delivery systems). В работах [266, 267] были исследованы гидрофильные и гидрофобные аэрогели на основе диоксида кремния в качестве матрицы для доставки кетопрофена и гризеофульвина. Было показано, что адсорбция и высвобождение лекарственных препаратов зависит от характеристик (плотности и гидрофобности) аэрогелей. Так, высвобождение кетопрофена из аэрогелевой матрицы происходило в 8 раз быстрее, чем растворение кристаллического препарата; в случае гризеофульвина скорость высвобождения препарата возрастала в 4 раза по сравнению с кристаллической формой, причем высвобождение лекарственных препаратов из гидрофильного аэрогеля происходило быстрее, чем из гидрофобного. В работе [145] впервые описано применение органических аэрогелей, полученных на основе полисахаридов, для доставки ибупрофена и парацетамола.

Аэрогели на основе диоксида кремния использовались в качестве твердой матрицы для иммобилизации таких энзимов, как пенициллин-G-амидаза (PGA), термолизин и  $\alpha$ -химотрипсин, что дало возможность их применения в средах с низким содержанием воды [268].

Благодаря пористости и крайне высокой удельной площади поверхности, аэрогели использовали в качестве матрицы для биосенсоров [269]. Так, крупнопористый  $SiO_2$  аэрогель, содержащий бактерии *Escherichia coli*, использовался в виде аэрозоля для обнаружения бактериофагов.

Высокопористые частицы органических аэрогелей, полученных из сахаров, используются для доставки лекарственных препаратов путем ингаляций [270], например, для доставки метадона при лечении героиновой зависимости.

Аэрогели являются одним и наиболее интересных и перспективных классов наноструктурированных высокопористых материалов. Они используются или предлагаются к использованию в различных областях, перечень которых быстро расширяется, в первую очередь благодаря перспективам применения аэрогелей в экологически безопасных технологиях. Считается, что в 2050 году аэрогели будут использоваться столь же широко, как пластмассы в настоящее время. Очевидно, что по мере проведения фундаментальных исследований будет происходить интенсивная коммерциализация таких материалов.

#### Литература

1. Kim J., Nakanishi H., Pollanen J., Smoukov S., Halperin W.P., Grzybowski B.A. *Small*, **7**, 2568 (2011)
2. *Aerogels Handbook*. (Eds Aegerter M.A., Leventis N., Koebel M.M.). Springer New York Dordrecht Heidelberg London, 2011, 932 P.
3. Gurav J.L., Jung I-K., Park H-H., Kang E.S., Nadargi D.N. *J. Nanomat.*, Article ID 409310 (2010)
4. Pierre A.C., Pajonk G.M. *Chem. Rev.*, **102**, 4243 (2002)
5. Sui R., Charpentier P. *Chem. Rev.*, **112**, 3057 (2012)
6. Deshpande R., Smith D.M., Brinker C.J. Patent US 5565142 (1996).
7. Kirkbir F., Murata H., Meyers D., Chaudhuri S. Ray. *J. Non-Cryst. Sol.*, **225**, 14 (1998)
8. Tajiri K., Igarashi K., Nishio T. *J. Non-Cryst. Sol.*, **186**, 83 (1995)
9. Yoda S., Ohshima S. *J. Non-Cryst. Sol.*, **248**, 224 (1999)
10. Asano T., Kitahara S. *Nippon Kagaku Kaishi*, **91** (2), 109 (1970)
11. Emmerling A., Fricke J. *J. Non-Cryst. Sol.*, **145**, 113 (1992)
12. a. Lermontov S.A., Malkova A. N., Yurkova L.L., Straumal E. A., Gubanova N.N., Baranchikov A. Ye., Ivanov V.K. *Mat. Lett.*, **116**, 116 (2014);  
b. Lermontov S., Malkova A., Yurkova L., Straumal E., Gubanova N., Baranchikov A., Smirnov M., Tarasov V., Buznik V., Ivanov V. *J. Supercr. Fluids*, **89**, 28 (2014)
13. Kistler S.S. *Nature*, **127**, 741 (1931)
14. Ayril A., Phalippou A., Woignier T. *J. Mater. Sci.*, **27**, 1166 (1992)
15. Zhou B., Shen J., Yuehua W., Wu G., Ni X. *Mater. Sci. Eng.*, **C27**, 1291 (2007)
16. Venkateswara Rao A., Parvathy Rao A., Kulkarni M.M. *J. Non-Cryst. Sol.*, **350**, 224 (2004)
17. Hwang S.-W., Jung H.-H., Hyun S.-H., Ahn Y.-S. *J. Sol Gel Sci. Technol.*, **41**, 139 (2007)
18. Flanigen E.M., Grose R.W. Patent US 3494874 (1970)

19. Voronkov M.G., Mileshevich V.P., Yuzhelevski Y.A. *The Siloxane Bond, Consultant Bureau*, New York, NY, USA, 1978
20. Tang Q., Wang T. *J. Supercrit Fluids*, **35**, 91 (2005)
21. Li T., Wang T. *Mater. Chem. Physics*, **112**, 398 (2008)
22. Nakanishi K., Minakuchi H., Soga N., Tanaka N. *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, **13**, 163 (1998)
23. Wagh P.B., Begag R., Pajonk G.M., Venkateswara Rao A., Haranath D. *Mater. Chem. Phys.*, **57**, 214 (1999)
24. Einarsrud M.A., Nilsen E., Rigacci A., Pajonk G.M., Buathier S., Valette D., Durant M., Chevalier P., Nitz P., Ehrburger-Dolle F. *J. Non-Cryst. Sol.*, **285**, 1 (2001)
25. Deng Z., Wang J., Wei J., Shen J., Zhou B., Chen L. *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, **19**, 677 (2000)
26. Venkateswara Rao A., Bhagat S.D., Hirashima H., Pajonk G.M. *J. Colloid Interface Sci.*, **300**, 279 (2006)
27. El Rassy H., Buisson P., Bouali B., Perrard A., Pierre A.C. *Langmuir*, **19**, 358 (2003)
28. Harreld J.H., Ebina T., Tsubo N., Stucky G. *J. Non-Cryst. Sol.*, **298**, 241 (2002)
29. Allié C., Pirard R., Lecloux A.J., Pirard J.P. *J. Non-Cryst. Sol.*, **246**, 216 (1999)
30. Rodriguez S.A., Colon L.A. *Anal. Chim. Acta*, **397**, 207 (1999)
31. Venkateswara Rao A., Haranath D. *Micropor. Mesopor. Mater.*, **30**, 267 (1999)
32. Livage J., Henry M., Sanchez C. *Prog. Solid State Chem.*, **18**, 259 (1988)
33. Schwertfeger F., Glaubitt W., Schubert U. *J. Non-Cryst. Sol.*, **145**, 85 (1992)
34. Schwertfeger F., Hüsing N., Schubert U. *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, **2**, 103 (1994)
35. Hüsing N., Schubert U., Misof K., Fratzl P. *Chem. Mater.*, **10**, 3024 (1998)
36. Venkateswara Rao A., Pajonk G.M. *J. Non-Cryst. Sol.*, **285**, 202 (2001)
37. Venkateswara Rao A., Kulkarni M.M. *Mater. Res.*, **37**, 1667 (2002)
38. Wagh P.B., Ingale S.V. *Ceramics International*, **28**, 43 (2002)
39. Venkateswara Rao A., Kulkarni M.M., Amalnerkar D.P., T.Seth. *J. Non-Cryst. Sol.*, **330**, 187 (2003)
40. Venkateswara Rao A., Kulkarni M.M., Pajonk G.M., Amalnerkar D.P., Seth T. *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, **27**, 103 (2003)
41. Hrubesh L.W., Coronado P.R., Satcher J.H. *J. Non-Cryst. Sol.*, **285**, 328 (2001)
42. Reynolds J.G., Coronado P.R., Hrubesh L.W. *Energy Sources*, **23**, 831 (2001)
43. Reynolds J.G., Coronado P.R., Hrubesh L.W. *J. Non-Cryst. Sol.*, **292**, 127 (2001)
44. Ilhan U.F., Fabrizio E.F., McCorkle L., Scheiman D.A., Dass A., Palczar A., Meador M.B., Johnston J.C., Leventis N. *J. Mater. Chem.*, **16**, 3046 (2006)
45. Yokogawa H., Yokogawa M. *J. Non-Cryst. Sol.*, **186**, 23 (1995)
46. Kartal A.M., Erkey C. *J. Supercritical Fluids*, **53**, 115 (2010)
47. Parale V.G., Mahadik D.B., Mahadik S.A., Kavale M.S., Venkateswara Rao A., Wagh P.B. *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, **63**, 573 (2012)
48. Parvathy Rao A., Pajonk G.M., Venkateswara Rao A. *J. Mater. Sci.*, **40**, 3481 (2005)
49. Venkateswara Rao A., Nilsen E., Einarsrud M.-A. *J. Non-Cryst. Sol.*, **296**, 165 (2001)
50. Kim C.-Y., Jang A.-R., Kim B.-I., Suh D.-H. *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, **48**, 336 (2008)
51. Wang J., Deng Z.S., Shen J., Chen L.Y. *J. Non-Cryst. Sol.*, **271**, 100 (2000)
52. Latthe S.S., Imai H., Ganesan V., Kappenstein Ch., Venkateswara Rao A. *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, **53**, 208 (2010)
53. Prakash S.S., Brinker C.J., Hurd A.J. *J. Non-Cryst. Sol.*, **190**, 264 (1995)
54. Bhagat S.D., Kim Y.-H., Suh K.-H., Ahn Y.-S., Yeo J.-G., Han J.-H. *Micropor. Mesopor. Mater.*, **112**, 504 (2008)
55. Mertens G., Fripiat J.J. *J. Colloid Interface Sci.*, **42**, 169 (1973)
56. Lee K.-H., Kim S.-Y., Yoo K.-P. *J. Non-Cryst. Sol.*, **186**, 18 (1995)
57. Pajonk G.M., Venkateswara Rao A., Sawant B.M., Parvathy N.N. *J. Non-Cryst. Sol.*, **209**, 4 (1997)
58. Baumann T.F., Gash A.E., Chinn S.C., Sawvel A.M., Maxwell R.S., Satcher Joe H.Jr. *Chem. Mater.*, **17**, 395 (2005)
59. Suh D.J., Park T.-J., Kim J.-H., Kim K.-L. *Chem. Mater.*, **9**, 1903 (1997)
60. Yoldas B.E. *J. Appl. Chem. Biotechnol.*, **23**, 803 (1973)
61. Yoldas B.E. *J. Mater. Sci.*, **10**, 1856 (1975)
62. Poco J.F., Satcher J.H.Jr., Hrubesh L.W. *J. Non-Cryst. Sol.*, **285**, 57 (2001)
63. Walendziewski J., Stolarski M. *React. Kinet. Catal. Lett.*, **71**, 201 (2007)
64. Harris M.R., Sing K.S.W. *J. Appl. Chem.*, **8**, 586 (1958)
65. Mizushima Y., Hori M. *J. Non-Cryst. Sol.*, **167**, 1 (1994)
66. Armor J.N., Carlson E.J. *J. Mater. Sci.*, **22**, 2549 (1987)
67. Gash A.E., Tillotson T.M., Satcher J.H., Poco J.F., Hrubesh L.W., Simpson R.L. *Chem. Mater.*, **13**, 999 (2001)
68. Gash A.E., Satcher J.H., Simpson R.L. *Chem. Mater.*, **15**, 3268 (2003)
69. Chervin C.N., Clapsaddle B., Chiu H.W., Gash A.E., Satcher J.H.Jr., Kauzlarich S.M. *Chem. Mater.*, **17**, 3345 (2005)
70. Itoh H., Tabata T., Kokitsu M., Okazaki N., Imizu Y., Tada A. *J. Ceramic Soc. Jap.*, **101**, 1081 (1993)
71. Gan L., Xu Z., Feng Y., Chen L. *J. Porous Mater.*, **12**, 317 (2005)
72. Tokudome Y., Fujita K., Nakanishi K., Miura K., Hirao K. *Chem. Mater.*, **19**, 3393 (2007)
73. Hund J.F., McElfresh J., Frederick C.A., Nikroo A., Greenwood A.L., Luo W. *Fusion Sci. Tech.*, **51**, 701 (2007)
74. Tokudome Y., Nakanishi K., Hanada T. *J. Ceramic Soc. Japan*, **117**, 351 (2009)
75. Guo Y., Meyer-Zaika W., Muhler M, Vukojević S., Epple M. *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2006**, 4774 (2006)
76. Aravind P.R., Mukundan P., Krishna Pillai P., Warriar K.G.K. *Micropor. Mesopor. Mat.*, **96**, 14 (2006)
77. Tamon H., Sone T., Mikami M., Okazaki M. *J. Colloid Interface Sci.*, **188**, 493 (1997)
78. Suh D.J., Park T.-J., Kim J.-H., Kim K.-L. *J. Non-Cryst. Sol.*, **225**, 168 (1998)
79. Osaki T., Horiuchi T., Sugiyama T., Suzuki K., Mori T. *J. Non-Cryst. Sol.*, **225**, 111 (1998)

80. Mizushima Y., Hori M. *J. Non-Cryst. Sol.*, **170**, 215 (1994)
81. Akkari R., Ghorbel A., Essayem N., Figueras F. *J. Sol-Gel Sci. Techn.*, **38**, 185 (2006)
82. Stöker C., Baiker A. *J. Non-Cryst. Sol.*, **223**, 165 (1998)
83. Ward D.A., Ko E.I. *J. Catal.*, **150**, 18 (1994)
84. Melado S., Ardizzone S.A., Bianchi C.L. *Micropor. Mesopor. Mat.*, **73**, 203 (2004)
85. Suh D.J., Park T.-J. *Chem. Mater.*, **14**, 1452 (2002)
86. Mrowiec-Białoń J., Pajak L., Jarzebski A.B., Lachowski A.I., Malinowski J.J. *J. Non-Cryst. Sol.*, **225**, 115 (1998)
87. Sui R., Rizkalla A.S., Charpentier P.A. *Langmuir*, **22**, 4390 (2006)
88. Zhang H.X., He X.D., Li Y., Hong C.Q. *J. Aero Mater.*, **26**, 337 (2006)
89. Zhao Z., Chen D., Jiao X. *J. Phys. Chem. C*, **111**, 18738 (2007)
90. Gash A.E., Tillotson T.M., Satcher J.H., Hrubesh L.W., Simpson R.L. *J. Non-Cryst. Sol.*, **285**, 22 (2001)
91. Campbell L.K., Na B.K., Ko E.I. *Chem. Mater.*, **4**, 1329 (1992)
92. Dagan G., Tomkiewicz M. *J. Phys. Chem.*, **97**, 12651 (1993)
93. Suh D.J., Park T.-J. *J. Mater. Sci. Let.*, **16**, 490 (1997)
94. Howells A.R., Fox M.A. *J. Phys. Chem. A*, **107**, 3300 (2003)
95. Chen X., Mao S. *Chem. Rev.*, **107**, 2891 (2007)
96. Kucheyev S.O., van Buuren T., Baumann T.F., Satcher J.H., Willey T.M., Meulenbergh R.W., Felter T.E., Poco J.F., Gammon S.A., Terminello L.J. *Phys. Rev. B*, **69**, 245102 (2004)
97. Yoda S., Otake K., Takebayashi Y., Sugeta T., Sato T. *J. Non-Cryst. Sol.*, **285**, 8 (2001)
98. Lafond V., Mutin P.H., Vioux A. *Chem. Mater.*, **16**, 5380 (2004)
99. Pietron J.J., Stroud R.M., Rolison D.R. *Nano Let.*, **2**, 545 (2002)
100. Kolenko Y.V., Kovnir K.A., Gavrilov A.I., Garshev A.V., Meskin P.E., Churagulov B.R., Bouchard M., Colbeau-Justin C., Lebedev O.I., Van Tendeloo G., Yoshimura M. *J. Phys. Chem. B*, **109**, 20303 (2005)
101. Baumann T.F., Kucheyev S.O., Gash A.E., Satcher J.H. *Adv. Mater.*, **17**, 1546 (2005)
102. Dong W., Yen S.-P., Paik J.-A., Sakamoto J. *J. Am. Ceram. Soc.*, **92**, 1011 (2009)
103. Krumm M., Pueyo C.L., Polarz S. *Chem. Mater.*, **22**, 5129 (2010)
104. Wang Ch.-T., Willey R.J. *J. Non-Cryst. Sol.*, **225**, 173 (1998)
105. Suh D.J., Park T., Kim W., Hong I. *J. Power Sources*, **117**, 1 (2003)
106. Sisk C.N., Hope-Weeks L.J. *J. Mater. Chem.*, **18**, 2607 (2008)
107. Gao Y.P., Sisk C.N., Hope-Weeks L.J. *Chem. Mater.*, **19**, 6007 (2007)
108. Gash A.E., Satcher J.H., Simpson R.L. *J. Non-Cryst. Sol.*, **350**, 145 (2004)
109. Wei T., Chen C., Chang K., Lu S., Hu C. *Chem. Mater.*, **21**, 3228 (2009)
110. Gill S.K., Shobe A.M., Hope-Weeks L.J. *Scanning*, **31**, 132 (2009)
111. Tillotson T.M., Sunderland W.E., Thomas I.M., Hrubesh L.W. *J. Sol-Gel Sci. Techn.*, **1**, 241 (1994)
112. Zhang H.D., Li B., Zheng Q.X., Jiang M.H., Tao X.T. *J. Non-Cryst. Sol.*, **354**, 4089 (2008)
113. Laberty-Robert C., Long J.W., Lucas E.M., Pettigrew K.A., Stroud R.M., Doescher M.S., Rolison D.R. *Chem. Mater.*, **18**, 50 (2006)
114. Reibold R.A., Poco J.F., Baumann T.F., Simpson R.L., Satcher J.H. *J. Non-Cryst. Sol.*, **319**, 241 (2003)
115. Reibold R.A., Poco J.F., Baumann T.F., Simpson R.L., Satcher J.H. *J. Non-Cryst. Sol.*, **341**, 35 (2004)
116. Clapsaddle B.J., Gash A.E., Satcher J.H., Simpson R.L. *J. Non-Cryst. Sol.*, **331**, 190 (2003)
117. Clapsaddle B.J., Sprehn D.W., Gash A.E., Satcher J.H., Simpson R.L. *J. Non-Cryst. Sol.*, **350**, 173 (2004)
118. Zhao L., Clapsaddle B.J., Satcher J.H., Schaefer D.W., Shea K.J. *Chem. Mater.*, **17**, 1358 (2005)
119. Chervin C.N., Clapsaddle B.J., Chiu H.W., Gash A.E., Satcher J.H., Kauzlarich S.M. *Chem. Mater.*, **17**, 3345 (2005)
120. Chervin C.N., Clapsaddle B.J., Chiu H.W., Gash A.E., Satcher J.H., Kauzlarich S.M. *Chem. Mater.*, **18**, 1928 (2006)
121. Brown P., Hope-Weeks L.J. *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, **51**, 238 (2009)
122. Cui H., Zayat M., Levy D. *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, **35**, 175 (2005)
123. Guo Y., Meyer-Zaika W., Muhler M., Vukojevic S., Epple M. *Eur. J. Inorg. Chem.*, **23**, 4774 (2006)
124. Barbieria O., Ehrburger-Dollea F., Rieker T.P., Pajonk G.M., Pinto N., Venkateswara Rao A. *J. Non-Cryst. Sol.*, **285**, 109 (2001)
125. Berthon S., Barbieri O., Ehrburger-Dolle F., Geissler E., Achard P., Bley F., Hecht A.-M., Livet F., Pajonk G.M., Pinto N., Rigacci A., Rochas C. *J. Non-Cryst. Sol.*, **285**, 154 (2001)
126. Schaefer D.W., Pekala R., Beaucage G. *J. Non-Cryst. Sol.*, **186**, 159 (1995)
127. Pekala R.W., Schaefer D.W. *Macromolecules*, **26**, 5487 (1993)
128. Pekala R.W. *J. Mater. Sci.*, **24**, 3221 (1989)
129. Pekala R.W., Alviso C.T., Le May J.D. *J. Non-Cryst. Sol.*, **125**, 67 (1990)
130. Pekala R.W. Patent US 4873218 (1989)
131. Tamon H., Ishizaka H. *J. Colloid Interface Science*, **223**, 305 (2003)
132. Lee H.-J., Song J.-H., Kim J.-H. *Materials Letters*, **37**, 197 (1998)
133. Fu R., Zheng B., Liu J., Dresselhaus M.S., Dresselhaus G., Satcher J. H. Jr., Baumann T.F. *Adv. Funct. Mater.*, **13**, 558 (2003)
134. Maldonado-Hódar F.J., Ferro-García M.A., Rivera-Utrilla J., Moreno-Castilla C. *Carbon*, **37**, 1199 (1999)
135. Ruben G.C., Pekala R.W. *J. Non-Cryst. Sol.*, **186**, 219 (1995)
136. Nguyen M.H., Dao L.H. *J. Non-Cryst. Sol.*, **225**, 51 (1998)
137. Pekala R.W. Patent US 5086085 (1992)
138. Barral K. *J. Non-Cryst. Sol.*, **225**, 46 (1998)
139. Zhang S.Q., Wang J., Shen J., Deng Z.S., Lai Z.Q., Zhou B., Attia S.M., Chen L.Y. *Nanostruct. Mater.*, **11**, 375 (1999)
140. Wu D., Fu R., Sun Z., Yu Z. *J. Non-Cryst. Sol.*, **351**, 915 (2005)

141. Grishechko L.I., Amaral-Labat G., Szczurek A., Fierro V., Kuznetsov B.N., Celzard A. *Micropor. Mesopor. Mater.*, **168**, 19 (2013)
142. Biesmans G., Randall D., Francais E., Perrut M. *J. Non-Cryst. Sol.*, **222**, 36 (1998)
143. Biesmans G., Mertensa A., Duffours L., Woignier T., Phalippou J. *J. Non-Cryst. Sol.*, **225**, 64 (1998)
144. García-González C.A., Alnaief M., Smirnova I. *Carbohydrate Polymers*, **86**, 1425 (2011)
145. Mehling T., Smirnova, Guenther U., Neubert R.H.H. *J. Non-Cryst. Sol.*, **355**, 2472 (2009)
146. Robitzer M., Renzo F.D., Quignard F. *Micropor. Mesopor. Mater.*, **140**, 9 (2011)
147. Robitzer M., Tourrette A., Horga R., Valentin R., Boissière M., Devoisselle J.M., Renzo F. Di, Quignard F. *Carbohydrate Polymers*, **85**, 44 (2011)
148. Tsiptsias C., Michailof C., Stauroopoulos G., Panayiotou C. *Carbohydrate Polymers*, **76**, 535 (2009)
149. Mallepally R.R., Bernard I., Marin M.A., Ward K.R., McHugh M.A. *J. Supercritical Fluids*, **79**, 202 (2013)
150. Grishechko L.I., Amaral-Labat G., Szczurek A., Fierro V., Kuznetsov B.N., Pizzi A., Celzard A. *Industrial Crops and Products*, **41**, 347 (2013)
151. Szczurek A., Amaral-Labat G., Fierro V., Pizzi A., Masson E., Celzard A. *Carbon*, **49**, 2773 (2011)
152. Baumann T.F., Satcher J.H.Jr. *J. Non-Cryst. Sol.*, **350**, 120 (2004)
153. Daniel C., Bernardo F. *Macromol. Symp.*, **303**, 37 (2011)
154. Daniel C., Giudice S., Guerra G. *Macromol. Symp.*, **273**, 135 (2008)
155. Kettunen M., Silvennoinen R.J., Houbenov N., Nykänen A., Ruokolainen J., Sainio J., Pore V., Kemell M., Ankerfors M., Lindström T., Ritala M., Ras R.H.A., Ikkala O. *Adv. Funct. Mater.*, **21**, 510 (2001)
156. Liebner F., Haimer E., Wendland M., Neouze M.-A., Schlufte K., Miethe P., Heinze T., Potthast A., Rosenau T. *Macromol. Biosci.*, **10**, 349 (2010)
157. Lee K.-N., Lee H.-J., Kim J.-H. *J. Supercritical Fluids*, **17**, 73 (2000)
158. Chao X., Jun S., Bin Z. *J. Non-Cryst. Sol.*, **355**, 492 (2009)
159. Sinkó K., Fél K., Zrínyi M. *Polym. Adv. Technol.*, **14**, 776 (2003)
160. Placin F., Desvergne J.-P., Cansell F. *J. Mater. Chem.*, **10**, 2147 (2000)
161. Yamashita J., Ojima T., Shioya M., Hatori H., Yamada Y. *Carbon*, **41**, 285 (2003)
162. Schaefer D.W., Beaucage G., Loy D.A., Shea K.J., Lin J.S. *Chem. Mater.*, **16**, 1402 (2004)
163. Kang P. Lee. Patent US 2005/0046086 A1 (2005)
164. Tamon H., Ishizaka H., Yamamoto T., Suzuki T. *Carbon*, **37**, 2049 (1999)
165. Bock V., Emmerling A., Fricke J. *J. Non-Cryst. Sol.*, **225**, 69 (1998)
166. Petricevic R., Reichenauer G., Bock V., Emmerling A., Fricke J. *J. Non-Cryst. Sol.*, **225**, 41 (1998)
167. Maldonado-Hodar F.J., Moreno-Castilla C., Rivera-Utrilla J., Hanzawa Y., Yamada Y. *Langmuir*, **16**, 4367 (2000)
168. Kuhn J., Brandt R., Mehling H., Petricevic R., Fricke J. *J. Non-Cryst. Sol.*, **225**, 58 (1998)
169. Bekyarova E., Kaneko K. *Langmuir*, **15**, 7119 (1999)
170. Bekyarova E., K Kaneko. *Adv. Mat.*, **12**, 1625 (2000)
171. Brandt R., Fricke J. *J. Non-Cryst. Sol.*, **350**, 131 (2004)
172. Wu Pei-di, Zhou B., Du A., Zhang Zhi-hua, Wu Guang-ming, Shen J. *Carbon*, **55**, 377 (2013)
173. Berthon-Fabry S., Langohr D., Achard P., Charrier D., Djurado D., Ehrburger-Dolle F. *J. Non-Cryst. Sol.*, **350**, 136 (2004)
174. Zhu Y., Hu H., Li W., Zhao H. *J. Non-Cryst. Sol.*, **352**, 3358 (2006)
175. Li Wen-Cui, Lu An-Hui, Guo Shu-Cai. *Carbon*, **39**, 1989 (2001)
176. Wu D., Fu R., Zhang S., Dresselhaus M. S., Dresselhaus G. *J. Non-Cryst. Sol.*, **350**, 209 (2004)
177. Wu D., Fu R., Zhang S., Dresselhaus M.S., Dresselhaus G. *Carbon*, **42**, 2033 (2004)
178. Tian H.Y., Buckley C.E., Paskevicius M., Wang S.B. *J. Supercritical Fluids*, **55**, 1115 (2011)
179. Moreno-Castilla C., Dawidziuk M. B., Carrasco-Marín F., Zapata-Benabithé Z. *Carbon*, **49**, 3808 (2011)
180. Fairén-Jiménez D., Carrasco-Marín F., Moreno-Castilla C. *Carbon*, **44**, 2301 (2006)
181. Wu D., Fu R. *Micropor. Mesopor. Mat.*, **96**, 115 (2006)
182. Jirglová H., Pérez-Cadenas A.F., Maldonado-Hódar F.J. *Langmuir*, **25**, 2461 (2009)
183. Amaral-Labat G., Szczurek A., Fierro V., Pizzi A., Masson E., Celzard A. *Micropor. Mesopor. Mater.*, **158**, 272 (2012)
184. Carrott P.J.M., Marques L.M., Ribeiro Carrott M.M.L. *Micropor. Mesopor. Mater.*, **131**, 75 (2010)
185. Cotet L.C., Gich M., Roig A., Popescu I.C., Cosoveanu V., Molins E., Danciu V. *J. Non-Cryst. Sol.*, **352**, 2772 (2006)
186. Chang X., Chen D., Jiao X. *Polymer*, **51**, 3801 (2010)
187. Chen Q., Long D., Chen L., Liu X., Liang X., Qiao W., Ling L. *J. Non-Cryst. Sol.*, **357**, 232 (2011)
188. Grzyb B., Hildenbrand C., Berthon-Fabry S., Bégin D., Job N., Rigacci A., Achard P. *Carbon*, **48**, 2297 (2010)
189. Guilminot E., Fischer F., Chatenet M., Rigacci A., Berthon-Fabry S., Achard P., Chainet E. *J. Power Sources*, **166**, 104 (2007)
190. Baker W. S. *J. Non-Cryst. Sol.*, **350**, 80 (2004)
191. Gouerec P., Miousse D., Tran-Van F., Dao L. H. *J. New Mater. Electrochemical Systems*, **2**, 221 (1999)
192. Talbi H., Just P.-E., Dao L.H. *J. Appl. Electroch.*, **33**, 465 (2003)
193. Sanchez C., Robot F. *New J. Chem.*, **18**, 1007 (1994)
194. Novak B.M., Auerbach D., Verrier C. *Chem. Mater.*, **6**, 282 (1994)
195. Huang H.H., Orlor B., Wilkes G.L. *Macromolecules*, **20**, 1322 (1987)
196. Hu Y., Mackenzie J.D. *J. Mater. Sci.*, **27**, 4415 (1992)
197. Mulik S., Sotiriou-Leventis C., Churu G., Lu Hongbing, Leventis N. *Chem. Mater.*, **20**, 5035 (2008)
198. Leventis N., Sadekar A., Chandrasekaran N., Sotiriou-Leventis C. *Chem. Mater.*, **22**, 2790 (2010)
199. Boday D.J., DeFriend K.A., Wilson K.V.Jr., Coder D., Loy D.A. *Chem. Mater.*, **20**, 2845 (2008)
200. Boday D.J., Stover R.J., Muriithi B., Keller M.W., Wertz J.T., DeFriend Obrey K.A., Loy D.A. *ACS Appl Mater Interfaces*, **1**, 1364 (2009)
201. Leventis N., Sotiriou-Leventis C., Mulik S., Dass A., Schnobrich J., Hobbs A., Fabrizio E.F., Juo H., Churu G., Zhang Y., Lu H. *J. Mater. Chem.*, **18**, 2475 (2008)
202. Mizushima Y., Hori M. *J. Non-Cryst. Sol.*, **170**, 215 (1994)



203. Leventis N., Vassilaras P., Fabrizio E.F., Dass A. *J. Mater. Chem.*, **17**, 1502 (2007)
204. Sanchez C., Ribot F., Lebeau B. *J. Mater. Chem.*, **9**, 35 (1999)
205. Katti A., Shimpi N., Roy S., Lu H., Eve F. Fabrizio, Dass A., Capadona L., Leventis N. *Chem. Mater.*, **18**, 285 (2006)
206. Zhang G., Dass A., Rawashdeh A.-M.M., Thomas J., Counsil J.A., Sotiriou-Leventis C., Fabrizio E.F., Ilhan F., Vassilaras P., Scheiman D.A., McCorkle L., Palczar A., Johnston J.C., Meador M.A., Leventis N. *J. Non-Cryst. Sol.*, **350**, 152 (2004)
207. Meador M.A.B., Capadona L.A., McCorkle L., Papadopoulos D.S., Leventis N. *Chem. Mater.*, **19**, 2247 (2007)
208. Leventis N., Sotiriou-Leventis C., Zhang G., Rawashdeh A.-M.M. *Nano Lett.*, **2**, 957 (2002)
209. Yim T.-J., Kim S.Y., Yoo K.-P. *Korean J. Chem. Eng.*, **19**, 159 (2002)
210. Leventis N., Palczar A., McCorkle L., Zhang G., Sotiriou-Leventis C. *J. Sol-Gel Sci. Techn.*, **35**, 99 (2005)
211. Bertino M.F., Hund J.F., Zhang G., Sotiriou-Leventis C., Tokuhiro A.T., Leventis N. *J. Sol-Gel Sci. Tech.*, **30**, 43 (2004)
212. Capadona L.A., Meador M.A.B., Alunni A., Fabrizio E.F., Vassilaras P., Leventis N. *Polymer*, **47**, 5754 (2006)
213. Hüsing N., Schubert U., Mezei R., Fratzl P., Riegel B., Kiefer W., Kohler D., Mader W. *Chem. Mater.*, **11**, 451 (1999)
214. Meador M.A.B., Fabrizio E.F., Ilhan F., Dass A., Zhang G., Vassilaras P., Johnston J.C., Leventis N. *Chem. Mater.*, **17**, 1085 (2005)
215. Ilhan U.F., Fabrizio E.F., McCorkle L., Scheiman D., Dass A., Palzer A., Meador M.A.B., Leventis N. *J. Mater. Chem.*, **16**, 3046 (2006)
216. Hüsing N., Schubert U. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **37**, 23 (1998)
217. Fricke J., Arduini-Schuster M.C., Büttner D., Ebert H.-P., Heinemann U., Hetfleisch J., Hümmel E., Kuhn J. *Therm. Conduc.*, **21**, 235 (1990)
218. Fricke J., Lu X., Wang P., Büttner D., Heineman U.J. *Heat Mass Transfer*, **35**, P.2305 (1992)
219. Lu X., Wang P., Arduini-Schuster M.C., Kuhn J., Büttner D., Nilsson O., Heinemann U., Fricke J. *J. Non-Cryst. Sol.*, **145**, 207 (1992)
220. Biesmans G., Randall D., Francais E., Perrut M. *Cell. Polym.*, **17**, 17 (1998)
221. Wolff B., Seybold G., Krueckau F.E. EP 0340707 (1989)
222. Quenard D., Chevalier B., Sallee H., Olive F., Giraud D. *Rev. Metall. Cah. Inf. Tech.*, **95**, 1149 (1998)
223. Schmidt M., Schwertfeger F. *J. Non-Cryst. Sol.*, **225**, 364 (1998)
224. Deng Z.S., Wang J., Wu A.M., Shen J., Zhou B. *J. Non-Cryst. Sol.*, **225**, 101 (1998)
225. Forest L., Gibiat V., Woignier T. *J. Non-Cryst. Sol.*, **225**, 287 (1998)
226. Conroy J.F.T., Hosticka B., Davis S.C., Smith A.N., Norris P.M. *Microscale Thermophys. Eng.*, **3**, 199 (1999)
227. Gronauer M., Fricke J. *Acustica*, **59**, 177 (1986)
228. Gerlach R., Kraus O., Fricke J., Eccardt P.-C., Kroemer N., Magori V. *J. Non-Cryst. Sol.*, **145**, 227 (1992)
229. Hrubesh L. W. *J. Non-Cryst. Sol.*, **225**, 335 (1998)
230. Jensen K.I. *J. Non-Cryst. Sol.*, **145**, 237 (1992)
231. Svendsen S. *J. Non-Cryst. Sol.*, **145**, 240 (1992)
232. Mulder C.A.M., van Lierop J.G. Aerogels. In *Springer Proceedings in Physics, V.6*. (Ed. J.Fricke). Springer, Heidelberg, 1986, P. 68
233. Ashley C.S., Reed S.T., Brinker C.J., Walko R.J., Ellefson R.E., Gill J.T. In *Chemical Processing of Advanced Materials*. (Eds L.L. Hench, J.K. West). Wiley, New York, 1992, P. 989
234. Gesser H.D., Goswani P.C./Chem. Rev., **89**, 765 (1989)
235. Pajonk G.M., Venkateswara Rao A. *Recent Res. Dev. Non-Cryst. Sol.*, **1**, 1 (2001)
236. Tian H.Y., Buckley C.E., Wang S.B., Zhou M.F. *Carbon*, **47**, 2128 (2009)
237. Tian H.Y., Buckley C.E., Paskevicius M., Wang S.B. *J. Supercritical Fluids*, **55**, 1115 (2011)
238. Aristov Y.I., Restuccia G., Tokarev M.M., Cacciola G. *React. Kinet. Catal. Lett.*, **69**, 345 (2000)
239. Juzkow M. *Aerogel Capacitors Support Pulse, Hold-Up, and Main Power Applications, Cooper Electronic Technologies, PowerStor Products Dublin, Calif, USA, 2002*
240. Li J., Wang X., Wang Y., Huang Q., Dai C., Gamboa S., Sebastian P.J. *J. Non-Cryst. Sol.*, **354**, 19 (2008)
241. Zapata-Benabithé Z., Carrasco-Marín F., Moreno-Castilla C. *J. Power Sources*, **219**, 80 (2012)
242. Venkateswara Rao A., Hegde N.D., Hirashima H. *J. Colloid. Interf. Sci.*, **305**, 124 (2007)
243. Venkateswara Rao A., Bhagat S D., Hirashima H., Pajonk G.M. *J. Colloid. Interf. Sci.*, **300**, 279 (2006)
244. Carrasco-Marín F., Fairén-Jiménez D., Moreno-Castilla C. *Carbon*, **47**, 463 (2009)
245. Emmerling A., Gross J., Gerlach R., Goswin R., Reichenauer G., Fricke J., Haubold H. G. *J. Non-Cryst. Sol.*, **125**, 230 (1990)
246. Wang C.-T., Wu C.-L., Chen I.-C., Huang Y.-H. *Sensors and Actuators B*, **107**, 402 (2005)
247. Gurav J.L., Venkateswara Rao A., Nadargi D.Y. *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, **50**, 275 (2009)
248. Pajonk G.M. *Appl. Catal.*, **72**, P.217 (1991)
249. Ward D.A., Ko E. *I. Ind. Eng. Chem. Res.*, **34**, 421 (1995)
250. Cauqui M.A., Rodriguez Izquierdo J.M. *J. Non-Cryst. Sol.*, **147–148**, 724 (1992)
251. Tang S., Sun G., Qi J., Sun S., Guo J., Xin Q., Haarberg G.M. *Chinese J. Catal.*, 3112 (2010)
252. Moreno-Castilla C., Maldonado-Hydar F.J. *Carbon*, **43**, 455 (2005)
253. Astier M., Bertrand A., Bianchi D., Chenard A., Gardes G.E.E., Pajonk G., Taghavi M.B., Teichner S.J., Villemin B. *Preparation of Catalysts. In Studies in Surface Science and Catalysis*. (Eds Delmon B., Jacobs P.A., Poncelet G.). Elsevier, Amsterdam, **1**, P. 315 (1976)
254. Matis G., Juillet F., Teichner S. *J. Bull. Soc. Chim. Fr.*, 1633 (1976)
255. Willey R.J., Lai H., Peri J.B. *J. Catal.*, **130**, 319 (1991)
256. Fanelli A.J., Burlew J.V., Marsh G.B. *J. Catal.*, **116**, 318 (1988)
257. Blanchard F., Pommier B., Reymond J.P., Teichner S.J. *J. Mol. Catal.*, **17**, 171 (1982)
258. Rousset J.L., Boukenter A., Champagnon B., Dumas J., Duval E., Quinson J.F., Serughetti J. *J. Physics: Condensed Matter*, **2**, 8445 (1990)
259. Pajonk G.M., Manzalji T. *Catalysis Letters*, **21**, 361 (1993)

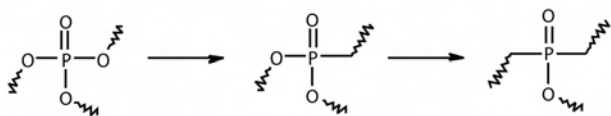
260. Sayari A., Ghorbel A., Pajonk G.M., Teichner S.J. *Reaction Kinetics and Catalysis Letters*, **15**, 459 (1981)
261. Machida M., Eguchi K., Arai H. *Chem. Lett. (Japan)*, 1993 (1986)
262. Machida M., Eguchi K., Arai H. *Chem. Lett. (Japan)*, 767 (1987)
263. Yan L.C., Thompson L.T./*Appl. Catal. A*, **71**, 219 (1998)
264. Pierre M., Buisson P., Fache F., Pierr, A. *Biocatal. Biotransform.*, **18**, 237 (2000)
265. Buisson P., Hernandez C., Pierre M., Pierre A.C. *J. Non-Cryst. Sol.*, **285**, 295 (2001)
266. Smirnova I., Suttiruengwong S., Arlt W. *J. Non-Cryst. Sol.*, **350**, 54 (2004)
267. Smirnova I., Mamic J., Arlt W. *Langmuir*, **19**, 8521 (2003)
268. Basso A., Martin L., Ebert C., Gardossi L., Tomat A., Casarci M., Rosi O.L. *Tetrah. Let.*, **41**, 8627 (2000)
269. Power M., Hosticka B., Black E., Daitch C., Norris P. *J. Non-Cryst. Sol.*, **285**, 303 (2001)
270. Lee K.P., Gould G.L. US patent 6994842 (2000)

# Двойная реакция Арбузова. Синтез фосфиновых кислот

В.В.Рагулин

Лаборатория фосфорорганических соединений ИФАВ РАН

Структурная модификация природных соединений — один из подходов к поиску новых ФАВ. Замена карбоновой группы в молекуле аминокислоты фосфоновым  $P(O)(OH)_2$  фрагментом позволяет построить молекулы фосфоновых аналогов природных аминокислот. Замена одной связи  $P-O$  или двух эфирных фрагментов  $O-P-O$  природного фосфата фосфоновым  $(PCH_2)$  или фосфиновым  $(CH_2PCH_2)$  фрагментами приводит к образованию гидролитически устойчивых фосфоновых или фосфиновых аналогов.



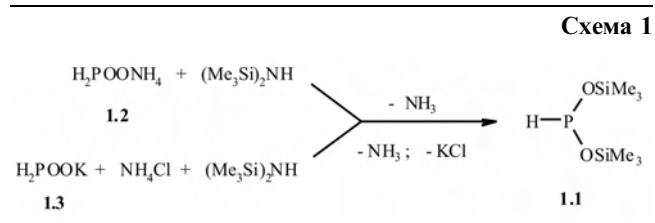
В связи с этим разработка новых удобных методов образования фосфор-углеродных связей является основной задачей в развитии методологии синтеза фосфорильных структурных изомеров природных соединений, аминокислот и пептидов.

Реакция Арбузова является одним из наиболее известных методов образования фосфор-углеродной связи. Классическая версия этого широко используемого метода обычно предполагает необходимость предварительного синтеза соответствующих эфиров кислот трехвалентного фосфора, выделение в качестве побочного продукта алкилгалогенида. В случае близкой реакционной способности последнего к реакционной способности исходного электрофила происхо-

дит образование побочных продуктов. Кроме того, для получения свободной фосфоновой или фосфиновой кислоты из образующегося в результате реакции фосфоната или фосфината необходим гидролиз, в результате чего сильно ограничен синтез функционально замещенных фосфиновых кислот, содержащих гидролитически лабильные группы.

Применение процедуры, включающей силилирование гидрофосфорильных соединений с образованием фосфорилирующего агента *in situ* в реакционной массе, и последующее взаимодействие его с соответствующим электрофилом позволяет разрешить эти проблемы. Алкоголиз силиловых эфиров протекает в мягких условиях с сохранением малоустойчивых функциональных групп, что позволяет разработать методы синтеза фосфорсодержащих аминокарбоновых кислот различного строения.

Методология образования двух фосфор-углеродных связей основывается на использовании уникального соединения — бис(триметилсилил)гипофосфита **1.1** (схема 1), синтез которого из гипофосфита аммония **1.2** впервые опубликовали М.Г.Воронков и Л.З.Мармур [1].



Наличие при трехвалентном атоме фосфора фрагментов  $P-H$  и  $POSiMe_3$  определяет весьма высокую потенциальную реакционную способность бис(триметилсилил)гипофосфита (**БСГ**) **1.1** в присоединении по типу реакций Михаэля, Пудовика, Абрамова и в превращениях по типу реакций Арбузова, Кабачника – Филдса.

Мы предложили новый подход к развитию методологии формирования фосфор-углеродных связей на основе этого уникального соединения, который представляет собой *one-pot* процедуру, проведение реакций генерируемого *in situ* бис(триметилсилил)гипофосфита и его участие в дальнейших превращениях без выделения различных последующих промежуточно образующихся продуктов. Чрезвычайно высокая чувствительность бис(триметилсилил)гипофосфита к гидролизу и окислению соответственно влагой и кислородом воздуха, его способность к самовоспламенению при доступе кислорода, обуславливают необходимость исключения операции предварительного получения и выделения ключевого интермедиата реакции. Поэтому развитие процедуры с проведением всей цепочки превращений в одном реакционном сосуде, без выделения бис(триметилсилил)гипофосфита, а также промежуточных силилфосфонитов и силилфосфинатов, является не просто, и не только удобным, а в большей степени необходимым подходом в развитии методологии формирования двух фосфор-углеродных связей и, несомненно, является большим преимуществом предлагаемого метода.

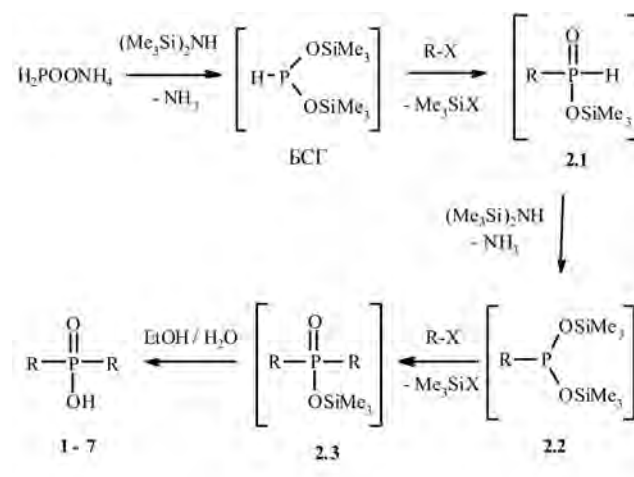
На первых стадиях исследования для подтверждения приводимой схемы реакции бис(триметилсилил)гипофосфит (БСГ) был получен взаимодействием гипофосфита аммония и гексаметилдисилазана, выделен в индивидуальном виде и затем вводился в реакцию с галогеналканами. Синтез диалкилфосфиновых кислот симметричного строения, осуществляли также используя смесь гипофосфита калия **1.3** и хлористого аммония. В этом случае выход бис(триметилсилил)гипофосфита несколько ниже (65%) по сравнению с выходом из аммонийгипофосфита (89%). Однако, использование гипофосфита калия расширяет возможности данного метода синтеза фосфиновых кислот. Гипофосфит натрия менее эффективен, так как он существует в виде гидрата.

### Синтез диалкилфосфиновых кислот

Мы нашли, что ключевой интермедиат предложенного нами метода синтеза диалкилфосфиновых кислот — бис(триметилсилил)гипофосфит (БСГ) (схема 2), способен последовательно взаимодействовать с двумя галоидными алкилами по

типу реакции Арбузова с образованием двух фосфор-углеродных связей [2]. Метод использует свойство гидрофосфорильных соединений под воздействием силилирующих агентов образовывать силиловые эфиры производных трехвалентного фосфора. Наличие достаточного количества силилирующего агента в сфере реакции способствует превращению промежуточно образующихся гидрофосфорильных соединений **2.1** в реакционноспособные силиловые эфиры трехвалентного фосфора — фосфониты **2.2** (см. схему 2).

Схема 2



Генерированные *in situ* эфиры **2.2** способны подвергаться новому превращению по типу реакции Арбузова с образованием второй фосфор-углеродной связи, что приводит к триметилсилиловым эфирам фосфиновых кислот **2.3**, после алкоголиза которых образуются целевые диалкилфосфиновые кислоты симметричного строения **1–7** (см. схему 2).

Наилучшие результаты (выходы фосфиновых кислот 40–70%) получены при использовании алкилбромидов нормального строения, хлористого бензила или хлоруксусного эфира. Применение иодалканов дает заметно худшие результаты (выход 17%), вероятно, вследствие протекания побочных реакций с участием триметилиодсилана, образующегося в ходе синтеза [3]. Однако, процедура проведения реакции предварительно генерированного *in situ* бис(триметилсилил)гипофосфита (БСГ) из гипофосфита аммония или калия и силазана с последующим охлаждением реакционной смеси и взаимодействием с двумя эквивалентами иодалкана в более

мягких условиях в сухом растворителе на холоду дает значительно лучшие результаты (40–70%).

В некоторых случаях в спектре ЯМР  $^{31}\text{P}$  реакционной массы на стадии образования целевого триметилсилилового диалкилфосфиновой кислоты наблюдались сигналы в области 10–20 м.д., соответствующие бис(триметилсилиловым) эфирам фосфоновых кислот, образующимся, вероятно, при окислении промежуточных силилфосфонитов, однако примеси составляли не более 3–5% и легко удалялись при выделении и очистке целевых продуктов.

Опубликованы результаты взаимодействия предварительно синтезированного БСГ и смеси триэтиламина с триметилхлорсиланом, которая позволяет получить диалкилфосфиновые кислоты с удовлетворительными выходами только при использовании высоко реакционных галогеналканов (аллилбромид, бензилбромид, бромуксусный эфир, бис(бромометил)нафталин и др.) [4–6].

Однако предложенная нами процедура генерирования *in situ* бис(триметилсилил)гипофосфита и его использования в дальнейших превращениях [2] показала высокую эффективность этого подхода к образованию фосфор-углеродных связей, что и было продемонстрировано последующими исследованиями [7–12].

### Синтез циклических фосфиновых кислот

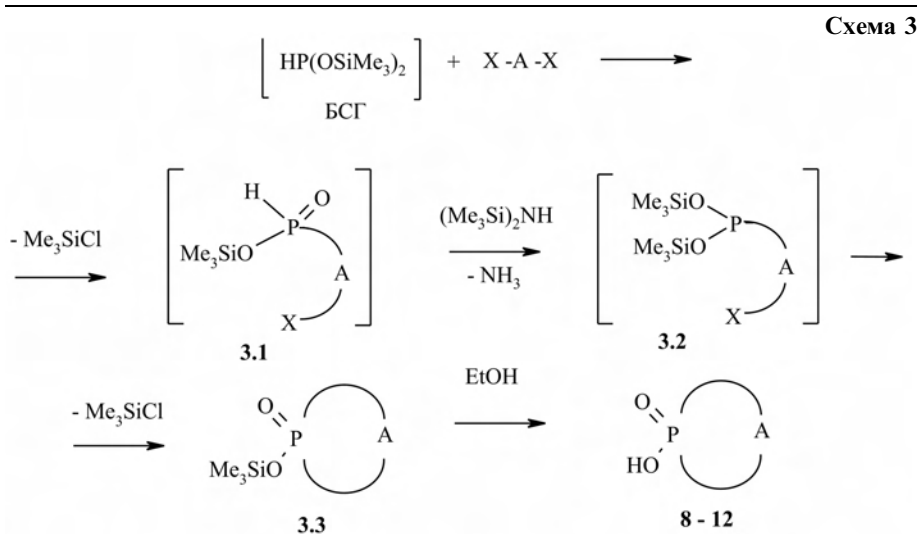
Циклические фосфиновые кислоты являются структурными аналогами циклических фосфодиэфиров, многие из которых играют важную метаболическую и регуляторную роль [13, 14]. Однако циклические фосфодиэфиры легко расщепляются гидролитически и ферментативно, что осложняет их изучение, а также использование для регуляции важных метаболических процессов. Эти трудности можно предотвратить, используя синтетические аналоги фосфодиэфиров — циклические фосфиновые кислоты.

Анализ литературных данных показал, что к началу

наших исследований не существовало удобного общего метода синтеза циклических фосфиновых кислот, позволяющего варьировать строение цикла. Развитие методологии генерируемого *in situ* из солей гипофосфористой кислоты бис(триметилсилил)гипофосфита (БСГ) с использованием в качестве галогенпроизводных  $\alpha,\omega$ -дигалогеналканов, позволяет предложить общий метод синтеза циклических фосфиновых кислот **8–12** (схема 3) [7].

Идеология синтеза основывается на последовательном образовании двух фосфор-углеродных связей с промежуточным силилированием гидрофосфорильной формы **3.1**, содержащей одну фосфор-углеродную связь, образовавшуюся в результате первой реакции Арбузова с участием бис(триметилсилил)гипофосфита (БСГ) *in situ* и молекулы  $\alpha,\omega$ -дигалогеналкана. Образовавшийся *in situ*  $\omega$ -галогеналкилфосфонит **3.2** содержит два реакционных центра — нуклеофильный атом трехвалентного фосфора, генерированный *in situ* в условиях реакции, и электрофильный  $\omega$ -углеродный атом при атоме галогена.

Это создает благоприятные условия для протекания внутримолекулярной реакции Арбузова в результате атаки неподеленной электронной пары атома фосфора по электрофильному  $\omega$ -углеродному атому с выделением триметилсилилгалогенида и образованием второй фосфор-углеродной связи и соответствующего силилового эфира циклического фосфината **3.3**,



величина цикла которого обусловлена длиной углеводородной цепочки А (см. схему 3).

Были получены пяти- и шестичленные циклические фосфиновые кислоты после алкоголиза соответствующих силиловых эфиров **3.3** с выходами 31–49%. Для уменьшения межмолекулярных реакций использовали разбавление абсолютным толуолом или смесью ксилолов.

Низкий выход 1-оксо-1-триметилсилилокси-3-фосфоленона (19%) можно объяснить существованием 1,4-дибром-2-бутена в основном в более стабильной *транс*-форме, которая при взаимодействии с бис(триметилсилил)гипофосфитом в присутствии силазана, вероятно, в большей степени дает полимерные продукты. Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  1-гидрокси-1-оксо-3-фосфоленона **12**, приведенный на рис. 1, представляет собой два дублета, обусловленные взаимодействием ядер  $^1\text{H}$  и  $^{31}\text{P}$ . Характер спектра свидетельствует о конформационной лабильности пятичленного фосфоленового цикла (относительно шкалы времени ЯМР), т.к. отсутствует более тонкая структура сигналов, обусловленная протон-протонным взаимодействием [7].

Для более напряженных пятичленных циклических фосфиновых кислот характерно появление сигнал ядра фосфора в спектре ЯМР  $^{31}\text{P}$  в области 75–84 м.д., в то время как для шестичленных циклов характерен химический сдвиг в области 40–60 м.д. [7].

Были проведены эксперименты с участием бромистого метилена и 1,2-дибромэтана с целью получить шестичленные трифосфорильные и дифосфорильные циклы соответственно. Несмотря на то, что в спектре ЯМР  $^{31}\text{P}$  реакционной массы присутствуют сигналы в области

40–60 м.д., соответствующие силиловым эфирам фосфиновых кислот, выделить какие-либо соединения не удалось. Вероятно, в ходе реакции происходит образование полифосфорильных соединений.

Множество различных диэлектрофилов, которые взаимодействуют с бис(триметилсилил)гипофосфитом — ключевым интермедиатом синтеза, и мягкие условия реакции могли бы в конечном счете сделать доступными широкий спектр циклических фосфиновых кислот с потенциальной биологической активностью.

Метод представляет собой короткий путь к целевым циклическим фосфиновым кислотам, в препаративном плане очень прост и найдет применение в синтезе аналогов природных циклических фосфатов. Действительно, привлекательность этого метода нашла подтверждение — вслед за нашей публикацией, посвященной синтезу диалкилфосфиновых и циклических фосфиновых кислот [7], предложенная нами процедура синтеза циклических соединений на основе генерированного *in situ* бис(триметилсилил)гипофосфита, образующегося из гипофосфита аммония и гексаметилдисилазана и взаимодействующего с  $\alpha,\omega$ -дигалогеналканами, была использована группой Montchamp J.-L., специализирующейся в области синтеза гетероциклов, с проведением синтеза в более высоко кипящем мезитиле [8].

### Функционально замещенные фосфиновые кислоты симметричного строения

Предложенная процедура синтеза диалкилфосфиновых кислот путем двойной арбузовской перегруппировки была распространена на использование в качестве функционально замещенных галогеналканов  $\omega$ -галогеналкилфосфорильных соединений, бензилгалогенидов, галогенуксусных эфиров и  $\omega$ -галогеналкилацетамидомалоновых эфиров.

Использование  $\omega$ -галогеналкилфосфорильных соединений в процедуре синтеза фосфиновых кислот симметричного строения позволяет получить соединения **13–16**, содержащие три фосфорильных фрагмента. При использовании диэтил 2-бромэтилфосфоната и 2-бромэтилдифенилфосфиноксида атомы фосфора образовавшейся молекулы целевой фосфиновой кислоты соединены двумя метиленовыми фрагментами  $\{\text{A} = (\text{CH}_2)_2\}$ , что приводит к характерному значи-

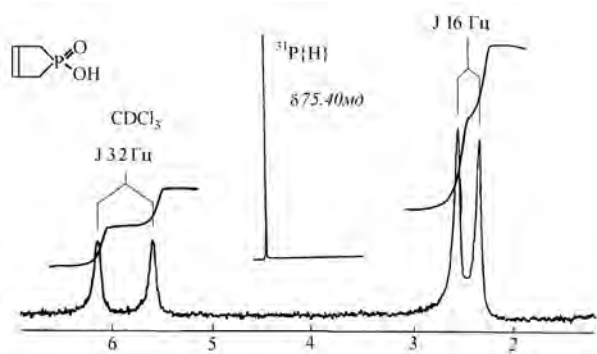


Рис. 1. Спектры ЯМР  $^{31}\text{P}$  и  $^1\text{H}$  1-гидрокси-1-оксо-3-фосфоленона **12** (25–30°C).

тельному расщеплению сигналов ядер фосфора в спектре ЯМР  $^{31}\text{P}$ . В спектрах наблюдаются два сигнала различной интенсивности. Дублеты 30.8 (для фосфонатного фрагмента) и 35.0 м.д. (для фосфиноксидного) и константой спин-спинового взаимодействия  $^3J_{\text{P-P}}$  69.0 Гц и  $^3J_{\text{P-P}}$  51.3 Гц отвечают двум крайним атомам фосфора образовавшейся молекулы соответственно фосфонатной или фосфиноксидной природы. Второй сигнал в спектре ЯМР  $^{31}\text{P}$  — триплет, обусловленный центральной фосфорильной функцией (рис. 2).

При увеличении или уменьшении числа метиленовых фрагментов в случае использования 3-бромпропилдифенилфосфиноксида или хлорметилдифенилфосфиноксида подобное спин-спиновое взаимодействие не наблюдали, спектр ЯМР  $^{31}\text{P}$  представляет собой два синглета, соотношение интенсивности сигналов — 2 : 1 [2].

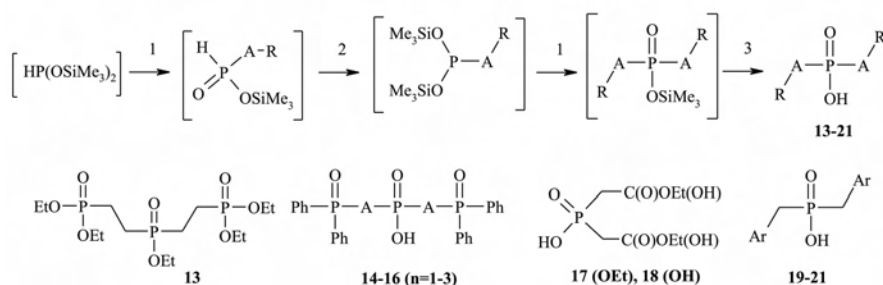
Необходимо отметить, что в процессе двойной арбузовской перегруппировки выделяется два эквивалента триметилсилилгалогенида, активность которого, например, триметилсилилбромид, достаточно высока, для того, чтобы в значительной степени дезалкилировать эфирные связи при атоме фосфора, что нами и было замечено при использовании диэтил-2-бромэтилфосфоната в качестве алкилгалогенида в исследуемой реакции. Использование алкилхлоридов сопровождается выделением триметилсилилхлорида, способность которого к побочной реакции дезалкилирования много ниже, однако и реакционная способность алкилхлоридов в целевом процессе двойной арбузовской перегруппировки заметно ниже по сравнению с бромидами.

В этом плане использование  $\omega$ -галогеналкилфосфиноксидов более предпочтительно по сравнению с аналогичными фосфонатами. Тем не менее,  $\omega$ -галогеналкилфосфонаты или фосфинаты с успехом могут быть использованы в процедуре двойной реакции Арбузова с добавлением стадии дополнительной этерификации целевого продукта, например, обработкой избытком триэтилортоформиата. В этом случае происходит этерификация всех кислых групп при атомах фосфора, в том числе и кислой функции при центральном атоме фосфора, и выделение полностью этерифицированного продукта не вызывает затруднений. Дополнительная этерификация трифосфорильного соединения была проведена нами в случае использования диэтил-2-бромэтилфосфоната в качестве галогеналкилкомпоненты в исследуемой реакции. Бис[(диэтилокси)фосфинил]этил]фосфиновая кислота была выделена после обработки триэтилортоформиатом в виде этилового эфира **13** хроматографией на силикагеле. Фосфиноксидный аналог **15**, спектр которого приведен на рис. 2, был получен с хорошим выходом, выделен и очищен хроматографией на силикагеле без дополнительной этерификации центральной кислой фосфиновой функции.

Симметричные фосфиновые кислоты **13–16**, содержащие фосфиноксидный или фосфонатный фрагменты, являются структурными аналогами комплексообразующих соединений — подандов, в молекуле которых наряду с двумя терминальными фосфорильными группами имеется еще гидроксифосфорильная функция в центре молекулы. Для синтеза симметричных фосфино-

вых кислот (**17–21**) в качестве галогенпроизводных использовались хлор- и бромуксусные эфиры и замещенные в ароматическом фрагменте бензилгалогениды (Ar = Ph (**19**), p-CF<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> (**20**), m-MeOC<sub>6</sub>H<sub>5</sub> (**21**)) (см. схему 4). Синтез фосфиновых кислот (**13–21**) проводили при одновременном смешивании всех исходных реагентов. Целевые продукты выделены и очищены хроматографией на

Схема 4

1. X-A-R, 2. (Me<sub>3</sub>Si)<sub>2</sub>NH, 3. EtOH/H<sub>2</sub>OX = Br, Cl; A = (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>, n = 1 (**14**), 2 (**15**), 3 (**16**), R = P(O)Ph<sub>2</sub>; n = 2, R = P(O)OEt<sub>2</sub> (**13**)  
n = 1, R = COOEt (**17**), COOH (**18**), Ar = Ph (**19**), p-CF<sub>3</sub>O-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub> (**20**), m-MeC(O)-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub> (**21**)

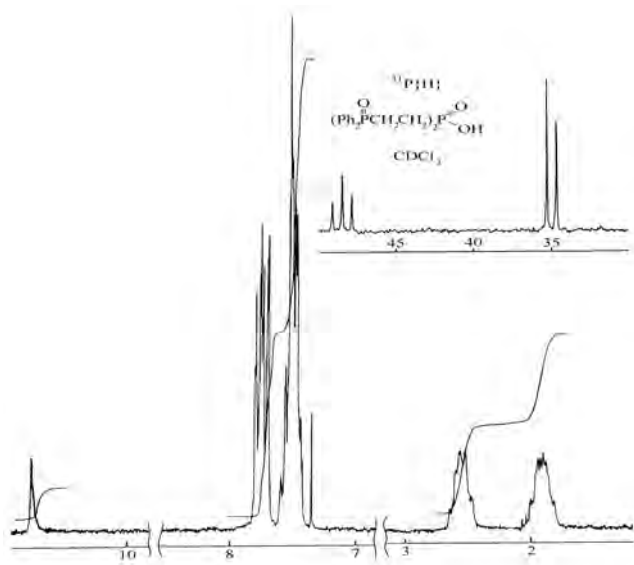


Рис. 2. Спектры ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{31}\text{P}$  бис[2-(дифенилфосфинил)этил]фосфиновой кислоты **15**.

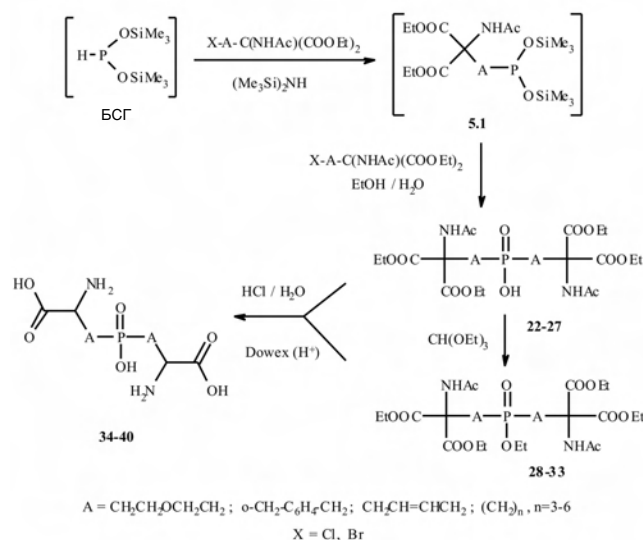
силикагеле и (или) кристаллизацией и представляют собой белые кристаллические вещества.

### Бис( $\omega$ -амино- $\omega$ -карбоновые) фосфиновые кислоты симметричного строения

Дальнейшее развитие методологии совмещения процессов образования фосфорилирующего агента и фосфорилирования в одном реакционном сосуде и методологии формирования двух фосфор-углеродных связей из гипофосфитов позволяет осуществить *one-pot* процедуру двойной арбузовской перегруппировки с использованием двух эквивалентов  $\omega$ -галогеналкилацетамидомалоновых эфиров. В качестве фосфорной компоненты в этом случае используется образующийся в реакционной смеси из солей гипофосфористой кислоты и гексаметилдисилазана бис(триметилсилил)гипофосфит (БСГ) *in situ*, взаимодействующий по схеме реакции Арбузова с молекулой  $\omega$ -галогеналкилацетамидомалонового эфира с образованием промежуточного гидрофосфорильного соединения, которое в присутствии гексаметилдисилазана образует силилфосфонит **5.1** (схема 5). Взаимодействие последнего *in situ* со второй молекулой  $\omega$ -галогеналкилацетамидомалонового эфира приводит к формированию второй фосфор-углеродной связи. Образующиеся фосфиновые кислоты симметричного строения выделяли chromatographically на силикагеле в виде собственно кислот **22–27** или соответствующих этиловых эфиров **28–33**, полу-

ченных взаимодействием сырого продукта синтеза с избытком триэтилортоформиата (см. схему 5).

Схема 5



Колоночная chromatography эфиров **28–33** на силикагеле по сравнению с chromatography кислот **22–27** более удобна. Полученные таким образом фосфиновые кислоты или их эфиры подвергались кислотному гидролизу с последующей ионообменной chromatography на катионите и выделением бисаминокарбоновых кислот симметричного строения **34–40**, содержащих в центре молекулы гидрофосфорильную функцию. Новые фосфиновые бисаминокарбоновые кислоты **34–40** представляют собой кристаллические вещества с характерной нечеткой точкой плавления (с разложением) [11].

### Синтез фосфиновых кислот несимметричного строения

Двойное присоединение по Михаэлю–Пудовику к разноименным непредельным соединениям.

Методология двойного постадийного присоединения БСГ *in situ* и промежуточных соответствующих бистриметилсилилфосфонитов **6.1**, **6.2**, **6.3** и **6.4** по Михаэлю–Пудовику с использованием разноименных непредельных соединений позволяет получить фосфиновые кислоты несимметричного строения в соответствии со схемой 6.

В качестве непредельного компонента были исследованы метилакрилат, дифенилвинилфосфиноксид, диэтилвинилфосфонат, которые с хорошими выходами в определенных условиях



образуют продукты 1 : 1 и 1 : 2-присоединения. В случае стирола получается только продукт 1 : 1-присоединения — фосфонит (**6.3**) даже в избытке непредельного компонента (см. схему 6).

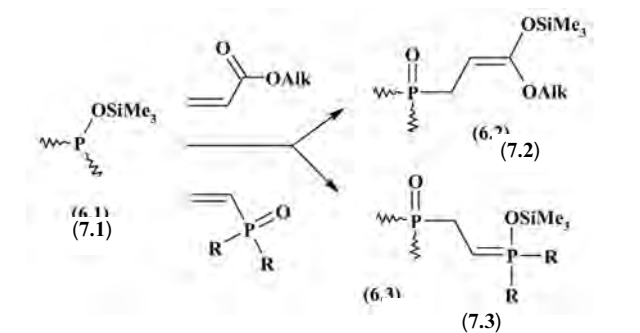
Отсутствие продукта двойного присоединения стирола позволяет исключить механизм 1,2-присоединения силилфосфонита (**7.1**) ко второй молекуле акрилата или винилфосфорильного соединения (схема 7). По-видимому, происходит присоединение атома фосфора к  $\beta$ -углеродному атому непредельного компонента и триметилсилильной группы — к атому кислорода группы C=O или P=O алкена с промежуточным образованием силилового эфира соответствующего енола (**7.2**) или илида (**7.3**) [15].

Найдены мягкие условия 1 : 1-присоединения бис(триметилсилил)гипофосфита к акрилатам и винилфосфорильным соединениям. Последующее 1,4-присоединение образовавшихся бис(триметилсилил) фосфонитов **6.1**, **6.2** и **6.4** к  $\alpha,\beta$ -непредельным соединениям (обычно без выделения из реакционной среды) позволяет получить фосфиновые кислоты несимметричного строения **27–30** (см. схему 6).

### Образование фосфор-углеродных связей в фосфиновых кислотах несимметричного строения путем последовательного осуществления реакций разного типа

Мы предлагаем общую стратегию синтеза с первоначальным присоединением бис(триметил-

Схема 7

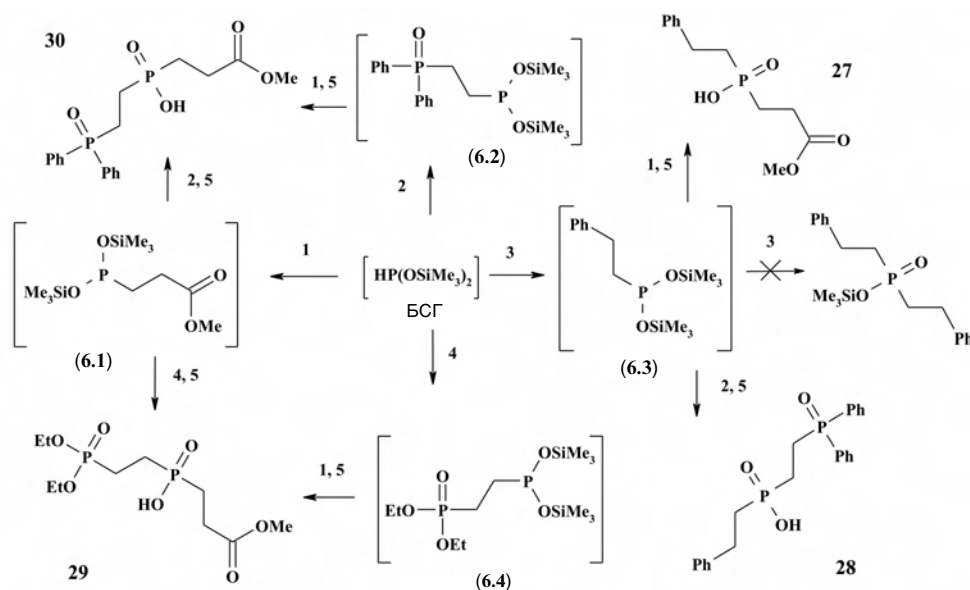


силил)гипофосфита к активированным алкенам по Михаэлю-Пудовику с образованием силиловых эфиров фосфонистых кислот [12, 15–20], которые способны вступать в различные реакции, характерные для производных трехвалентного фосфора, например, реакции Арбузова, Абрамова, Кабачника–Филдса, Михаэля–Пудовика и другие реакции. В качестве непредельных соединений были исследованы стирол, эфиры  $\alpha,\beta$ -непредельных карбоновых кислот, винилфосфонат и основания Шиффа.

### Акрилаты в качестве непредельного компонента синтеза

Использование в качестве непредельного компонента реакционноспособных  $\alpha,\beta$ -непредельных карбоксильных соединений позволяет получить различные фосфиновые карбоновые кислоты несимметричного строения (схема 8). Бис(триметилсилил)гипофосфит (БСГ) *in situ*

Схема 6



1 -  $\text{CH}_2=\text{CHCOOMe}$ , 2 -  $\text{Ph}_2\text{P}(\text{O})\text{CH}=\text{CH}_2$ , 3 -  $\text{PhCH}=\text{CH}_2$ , 4 -  $(\text{EtO})_2\text{P}(\text{O})\text{CH}=\text{CH}_2$ , 5 -  $\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$

присоединяется по активированной двойной углерод-углеродной связи акрилата с образованием фосфонитов, которые далее алкилируют галогенпроизводными по типу реакции Арбузова, Алкоголиз полученных силилфосфинатов дает целевые фосфиновые карбоновые кислоты [17, 20]. Образование ключевого интермедиата синтеза фосфонита (**31**) ( $\text{R} = \text{H}$ ) (продукта присоединения БСГ к ме-

тилакрилату) проходит экзотермически и подтверждено методами спектроскопии ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{31}\text{P}$ . Его превращения могут пойти по двум различным направлениям. В условиях получения БСГ (100–120°C) и в избытке акрилата основным результатом реакции является продукт присоединения двух молекул акрилата по типу реакций Михаэля–Пудовика — симметричная фосфиновая кислота (39).

В более мягких условиях (температура не выше 20–40°C) и при относительном недостатке метилакрилата можно избежать или свести к минимуму образование побочного продукта симметричного строения. В этом случае можно направить взаимодействие фосфонита 31 с галогеналканами по схеме реакции Арбузова с образованием различных фосфиновых кислот несимметричного строения (34–38). Процесс проводили в *one-pot* варианте — без выделения промежуточных продуктов [17] (см. схему 8).

При взаимодействии диметилового эфира малеиновой кислоты с БСГ не было обнаружено образования симметричного продукта присоединения двух молекул алкена даже при 100–120°C. Возможной причиной является меньшая реакционная способность этого непредельного соединения, обусловленная большим простран-

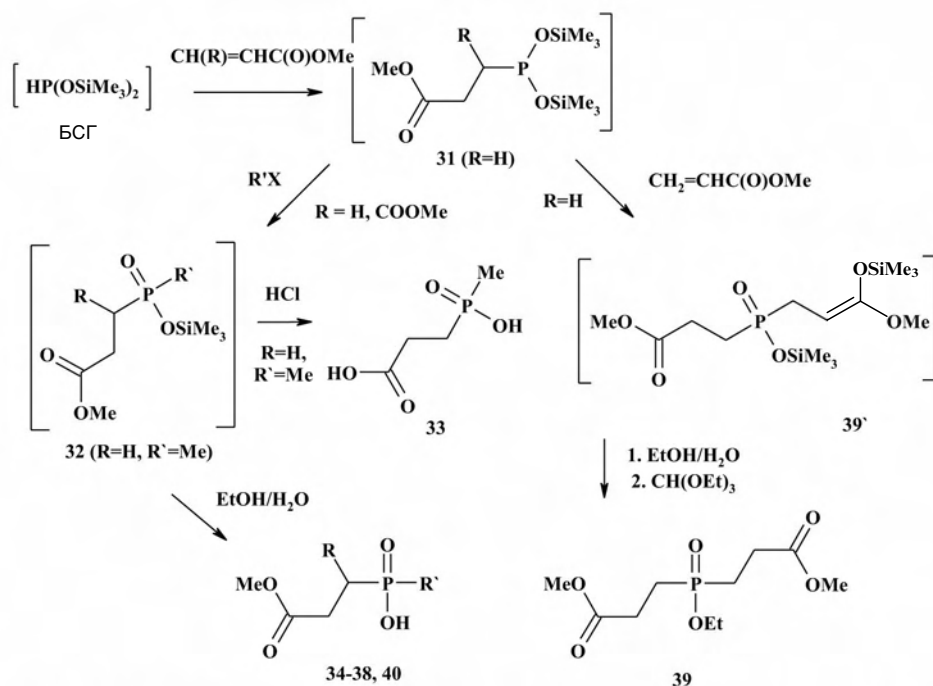
ственным экранированием двойной связи диметилового эфира малеиновой кислоты по сравнению с метилакрилатом.

При использовании в качестве галогеналкана метилиодида в ходе реакции образуется триметилиодсилан, который способен частично дезалкилировать метилоксикарбонильную группу в силилфосфинате. Алкоголиз и последующий кислотный гидролиз образующегося продукта дают целевую кислоту  $\text{MeP(O)(OH)CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$  (33).

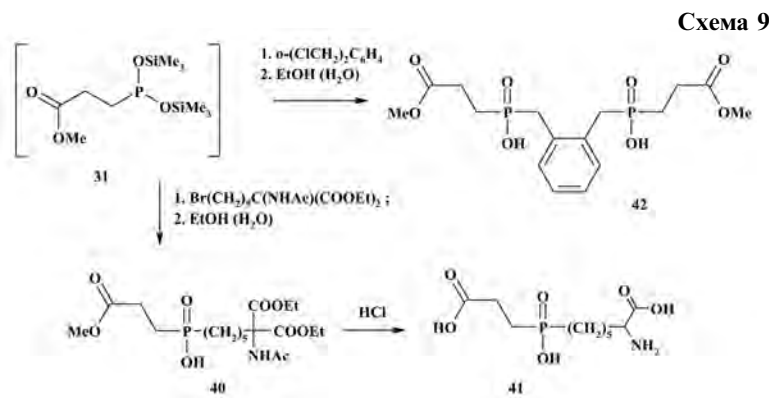
В случае активированных хлоралканов и функционально замещенных бромалканов реакции идут однозначно, не осложняются побочными процессами и приводят к различным фосфиновым кислотам несимметричного строения.

Применение 5-бромамилацетамидомалеинового эфира позволяет получить фосфиновую кислоту 40, в результате кислотного гидролиза которой образуется новый тип фосфиновых аминокарбоновых кислот 41. Введение в реакцию  $\alpha,\omega$ -дигалогеналканов приводит к потенциальным фосфорсодержащим комплексообразователям — подандам 42, что показано на примере *o*-ксилилендихлорида (схема 9).

Схема 8



R=H: R'=Me (32,33), Bn (34),  $(\text{CH}_2)_2\text{P(O)Ph}_2$  (35),  $(\text{CH}_2)_3\text{N-Phth}$  (36),  $(\text{CH}_2)_5\text{C(NHAc)(COOEt)}_2$  (40);  
 R=C(O)OMe : R'=Bn (37), R'=Oct (38);  
 X = I, Br, Cl



### Винилфосфонат в качестве неопредельного компонента синтеза

Ключевой интермедиат синтеза бис(триметилсилил) фосфоэтилфосфонит **10.1** был алкилирован по типу реакции Арбузова. Для образования второй фосфор-углеродной связи использовали N-(3-бромпропил)фталимид. Мягкие условия присоединения БСГ к диэтиловому эфиру винилфосфоновой кислоты позволяют исключить или свести к минимуму образование продукта двойного присоединения по Михаэлю–Пудовику и получить бис(триметилсилиловый) эфир β-(диэтоксифосфинил)этилфосфонистой кислоты (**10.1**). Это интермедиат далее был использован в синтезе новых бисфосфорильных аналогов γ-аминомасляной (ГАМК) (**43**) (схема 10) и глутаминовой кислот (**44**) (схема 11).

Наряду с целевым продуктом реакции — γ-(фталилимино)пропилфосфинатом **45** (см. схему 10), был выделен бис[β-(диэтоксифосфинил)этил]фосфинат **13** симметричного строения. Последний является продуктом присоединения второй молекулы винилфосфоната к промежуточному силлилфосфоэтилфосфониту **10.1** через стадию образования силлилфосфината **10.2**. Кислотный гидролиз γ-(фталилимино)пропилфосфината **45** дает бисфосфорильный аналог ГАМК **43**.

Синтез бисфосфорильного аналога глутаминовой кислоты **44** был осуществлен взаимодействием ключевого интермедиата фосфоэтилфосфо-

нита **11.1** *in situ* с избытком дибромэтана (см. схему 11).

После алкоголиза образуется 2-(диэтоксифосфинил)этил-2-бромэтилфосфиновая кислота **11.2** (зарегистрировано с помощью спектроскопии ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{31}\text{P}$ ), которую без выделения обрабатывали избытком триэтилортоформиата. Протекающие одновременно процессы дегидробромирования и этерификации кислоты **11.2** приводят к триэтиловому эфиру β-(фосфо-

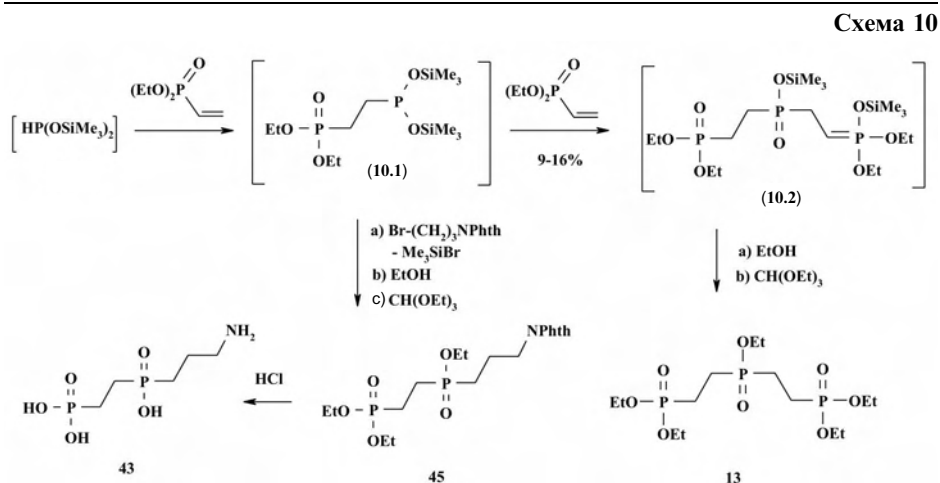
но)этилвинилфосфиновой кислоты **46**. Присоединение аминокислотной функции с последующим кислотным гидролизом продукта реакции **11.3** и ионообменной хроматографией позволяет получить целевую аминокислоту **44** — бисфосфорильный аналог глутаминовой кислоты [12].

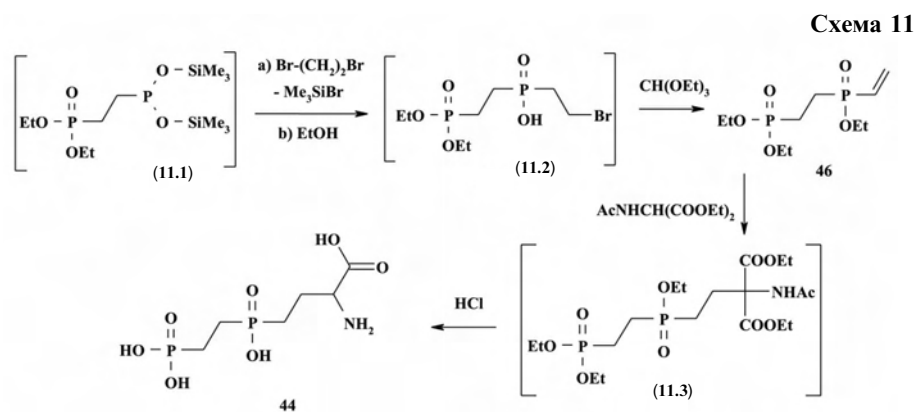
### Стирол в качестве неопредельного компонента синтеза

#### Реакция Арбузова на втором этапе синтеза

Стирол, в отличие от акрилатов и винилфосфорильных соединений, образует с БСГ только продукт 1:1-присоединения даже при высоких температурах и избытке по отношению к фосфорному компоненту. По этой причине данный алкен наиболее активно использовался при изучении предлагаемого метода. В качестве галогеналканов для образования второй фосфор-углеродной связи были исследованы метилиодид, бензилхлорид, хлорацетат, алкилбромиды, ω-бромалкилфосфиноксиды [16–18].

При одновременном смешивании и кипячении стирола, гипофосфита аммония и гексаме-





тилдисилазана в течение 3–4 часов смеси с высоким выходом (87%) образуется бис(триметилсилиловый) эфир фенетилфосфонистой кислоты **47**. Это показано методом спектроскопии ЯМР  $^{31}\text{P}$  и  $^1\text{H}$  спектроскопии, а также экспериментом с выделением фосфонита **47** в индивидуальном виде. При использовании смеси гипофосфита калия и хлорида аммония выход соединения **47** снижается до 75%.

Синтез целевых фосфиновых кислот **48–55** осуществляли в одном реакционном сосуде без выделения промежуточных соединений (схема 12). Использование в качестве галогенпроизводных  $\alpha,\omega$ -дигалогеналканов позволяет получить  $\alpha,\omega$ -алкиленбисфосфиновые кислоты **56–59** (схема 13) [17].

Фосфонит **47** способен окисляться, поэтому в некоторых случаях в спектре ЯМР  $^{31}\text{P}$  реакционной массы присутствует примесный (3–5%) сигнал в области 25.0 м.д., соответствующий бис(триметилсилиловому) эфиру фенетилфосфоновой кислоты. Этот побочный продукт

легко отделяется при выделении целевых фосфиновых кислот **48–59**.

### Синтез $\omega$ -аминоалкилфосфиновых кислот

Для образования второй фосфор-углеродной связи по реакции Арбузова были использованы также  $\omega$ -функционально замещенные галогеналканы. Их взаимодей-

действие с фосфонитом **47** *in situ* позволило синтезировать новые функционально замещенные фосфиновые кислоты **60–65**.

При использовании N-( $\omega$ -бромалкил)фталимидов образуются  $\omega$ -(N-фталилимино)алкилфенетилфосфиновые кислоты **60–62**, гидролиз которых дает соответствующие  $\omega$ -аминоалкилфосфиновые кислоты **63–65** (схема 14) [18].

### Реакция Абрамова на втором этапе синтеза

#### $\alpha$ -Гидроксиалкилфосфиновые кислоты

Методология синтеза фосфиновых кислот несимметричного строения получила дальнейшее развитие с использованием карбонильных соединений, которые реагируют с силилфосфонитами, образуясь в результате присоединения БСГ *in situ* к алкенам. Это превращение позволило получить ряд новых  $\alpha$ -гидроксиалкилфосфиновых кислот **67–76** (схема 15).

Фосфониты  $\text{HX-CH}_2\text{P(OSiMe}_3)_2$  (**47**, **66**), продукты присоединения БСГ *in situ* к молекуле активированного алкена ( $\text{CH}_2=\text{X}$ ), способны в свою очередь *in situ* присоединяться по  $\text{C}=\text{O}$ -связи альдегида или кетона по типу реакции Абрамова. В результате образуются  $\alpha$ -гидроксиалкилфосфиновые кислоты (**67–76**) после алкоголиза соответствующих силлиловых эфиров (схема 15). В качестве непредельного компонента синтеза были исследованы этилакрилат и стирол, в качестве карбонильной компонента — ацетон, изомасляный альдегид, бензальдегид,  $n$ -(метокси)бензальде-

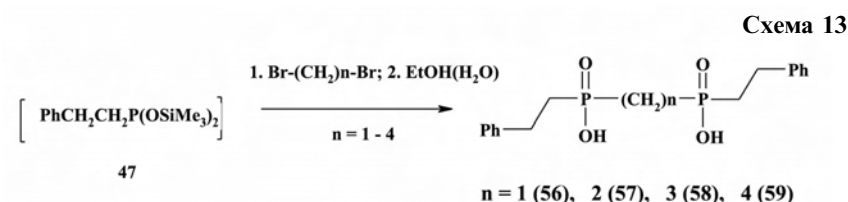
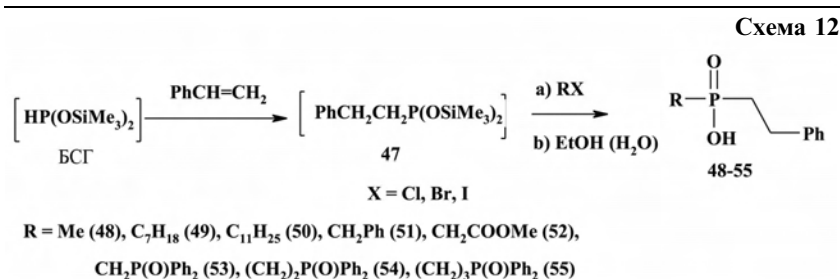


Схема 14

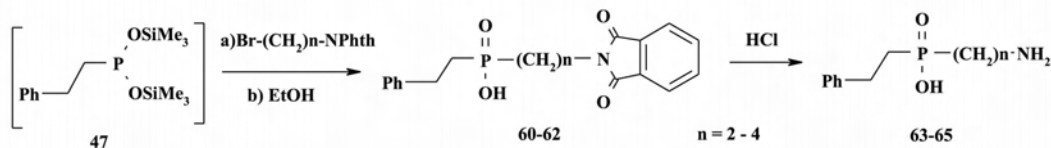
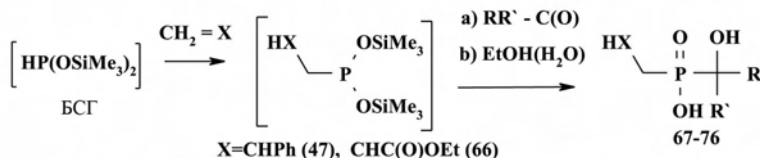


Схема 15



X = CHC(O)OEt;

R = Ph, R' = H (67), R = R' = Me (68), R = Ph, R' = Me (69), R = R' = Ph (70),

R = p-MeOC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>, R' = H (71), R = p-Me<sub>2</sub>N-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>, R' = H (72) X = CHPh;R = R' = Me (73), R = CHMe<sub>2</sub>, R' = H (74), R = Ph, R' = H (75), R = p-MeO-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>, R' = H (76)

гид, *n*-(диметиламино)бензальдегид, ацетофенон, бензофенон (схема 16) [18].

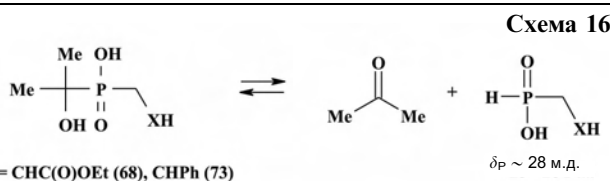


Схема 16

Новые α-гидроксиалкилфосфиновые кислоты **67–76** — относительно термически нестабильные кристаллические вещества.

Фосфиновые кислоты **68** и **73**, содержащие 1-гидрокси-1-метилэтильный фрагмент (т.е. полученные из ацетона), наиболее неустойчивы и диссоциируют на исходные соединения, что подтверждает обратимый характер реакции Абрамова (см. схему 16) [19].

α-аминоалкилфосфиновых кислот.

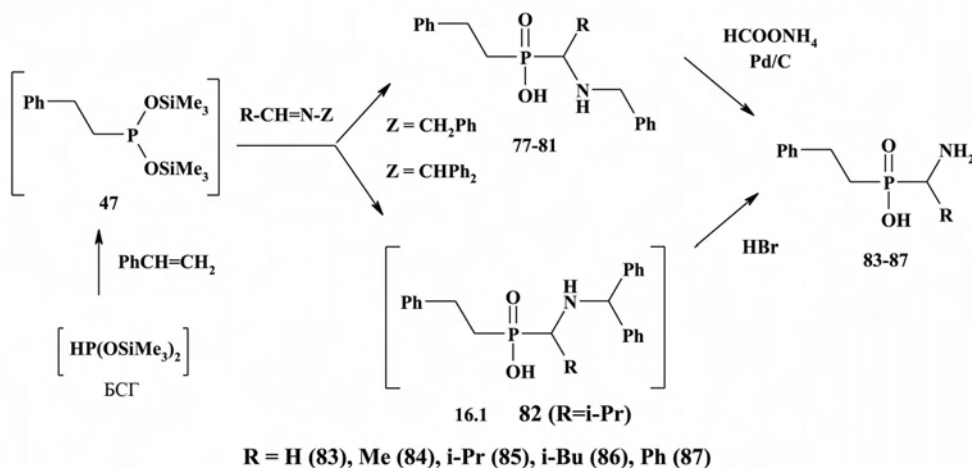
Бис(триметилсилил)фосфонит, образующийся в результате присоединения бис(триметилсилил)гипофосфита *in situ* к стиролу (**47**) (схема 17) или α-замещенному акрилату (**18.1**) (схема 18), *in situ* присоединяется к шиффовым основаниям [18, 19].

Последние были предварительно получены из бензиламина, дифенилметиламина (см. схему 17) или тритиламина (см. схему 18) и соответствующих альдегидов.

Снятие N-защитных групп путем гидрогенолиза или кислотного гидролиза, а также удаление эфирных функций кислотным гидролизом приводит к свободным α-аминоалкил-фосфиновым кислотам **83–90** (см. схемы 17, 18) [19, 20].

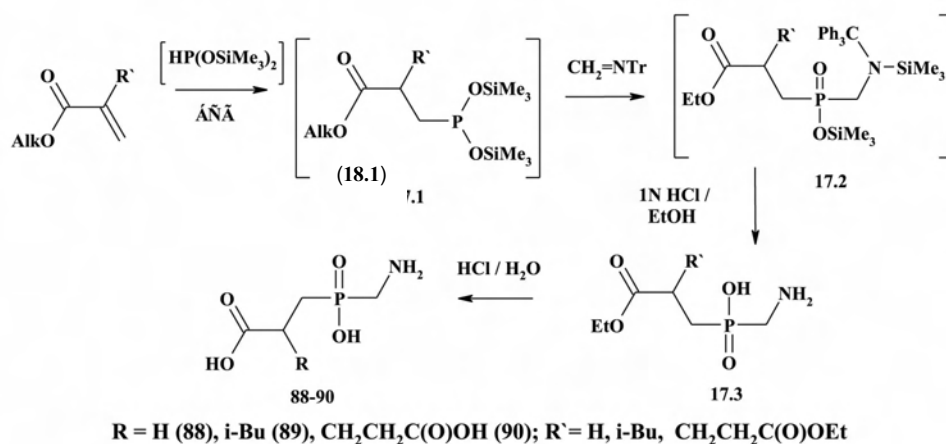
Таким образом, развитие двойной реакции

Схема 17



Арбузова и последующая ее модификация с использованием непредельных соединений позволили осуществить синтез оригинальных функционально замещенных фосфиновых кислот симметричного и несимметричного строения, трудно доступных с использованием других синтетических методов.

Схема 18



## Литература

1. М.Г.Воронков, Л.З.Мармур. *Журн. общ. химии*, **40** (9), 2135 (1970)
2. В.В.Рагулин, Е.Н.Цветков. *Изв. АН СССР. Сер. хим.*, (11), 2652 (1988) [V.V.Ragulin, E.N.Tsvetkov. *Russ. Chem. Bull.*, **37** (11), 2393 (1988)]
3. J.Chojnowski, M.Суррык, J.Michalski. *J. Organomet. Chem.*, **215** (3), 355 (1981)
4. P.Majewski. *Phosphorus, Sulfur.*, **45** (3-4), 151 (1989)
5. E.A.Boyd, A.C.Regan, K.James. *Tetrahedron Lett.*, **35** (24), 4223 (1994)
6. E.A.Boyd, M.E.K.Boyd, F.Kerrigan. *Tetrahedron Lett.*, **37** (30), 5425 (1996)
7. В.В.Рагулин, Н.Р.Курдюмова, Е.Н.Цветков. *Журн. общ. химии*, **64** (3), 419-422 (1994)
8. J.-L.Montchamp, F.Feng Tian, J.W.Frost. *J. Org. Chem.*, **60** (19), 6076 (1995)
9. В.В.Рагулин, В.В.Григорьев, В.А.Неманова, Е.Н.Цветков. *Хим.-фарм. журн.*, (3), 50 (1991)
10. Н.Р.Курдюмова, В.В.Рагулин, Е.Н.Цветков. *Журн. общ. химии*, **66** (8), 1402 (1996)
11. Н.Р.Курдюмова, В.В.Рагулин, Е.Н.Цветков. *Журн. общ. химии*, **69** (7), 1122 (1999)
12. Н.Р.Курдюмова, В.В.Рагулин. *Журн. общ. химии*, **69** (7), 1126 (1999)
13. J.P.Richard. *J. Am. Chem. Soc.*, **106** (17), 4926-4936 (1984)
14. J.L.Montchamp, J.W.Frost. *J. Org. Chem.*, **59** (25), 7596-7601 (1994)
15. В.В.Рагулин. *Журн. общ. химии*, **86** (12), 2074-2077 (2016) [V.V.Ragulin. *Russian Journal of General Chemistry*, **86** (12), 2706-2709 (2016)]
16. N.R.Kurdyumova, V.V.Ragulin, E.N.Tsvetkov. *Mendeleev Commun.*, **2**, 69-70 (1997)
17. Н.Р.Курдюмова, Л.Ф.Рожко, В.В.Рагулин, Е.Н.Цветков. *Журн. общ. химии*, **67** (12), 1965-1969 (1997)
18. Н.Р.Курдюмова, Л.Ф.Рожко, В.В.Рагулин, Е.Н.Цветков. *Журн. общ. химии*, **67** (12), С.1970-1973 (1997)
19. Л.Ф.Рожко, В.В.Рагулин. *Журн. общ. химии*, **74** (7), 1177-1181 (2004)
20. М.Э.Дмитриев, В.В.Рагулин. *Журн. общ. химии*, **81** (9), 1446-1451 (2011) [M.E.Dmitriev, V.V. Ragulin. *Russian Journal of General Chemistry*, **81** (9), 1786-1791 (2011)]

# Методология синтеза фосфиновых пептидов — ингибиторов металлопротеиназ

М.Э.Дмитриев, В.В.Рагулин

Лаборатория фосфорорганических соединений ИФАВ РАН

## 1. Введение

Создание методов образования новой фосфор-углеродной связи — одна из фундаментальных задач медицинской органической химии. В значительной степени это связано с тем, что фосфор-углеродная связь в фосфонатах и фосфинатах, в отличие от природной фосфор-кислородной связи, устойчива к гидролитическому и ферментативному расщеплению, что позволяет использовать их как соединения-имитаторы, как инструмент регулирования ряда метаболически важных процессов.

Замена кислой карбоновой функции в молекуле аминокислоты дигидроксифосфорильным фрагментом является известным ключом для построения молекулы аминокислоты (рис. 1, пример *a*). Для ингибирования нежелательных ферментативных реакций с участием соединений пептидного строения используются фосфиновые кислые псевдо-пептиды, у которых пептидная связь  $\{C(O)NH\}$  заменена на негидролизующий  $\{P(O)(OH)CH_2\}$  метилефосфорильный фрагмент (рис. 1, пример *b*).

Такая замена является структурно близкой имитацией переходного состояния пептидного гидролиза и ферментативных процессов с тетракоординированным атомом углерода с участием не менее двух больших классов гидролитических ферментов, металлозависимых протеиназ и аспартилпротеиназ (рис. 2, *a*) [1,2].

В последние 20 лет этот подход используется в качестве основного ключа для построения

фосфиновых кислых изостеров пептидов и является весьма плодотворным в плане поиска лекарственных средств для лечения сердечно-сосудистых заболеваний, противоопухолевых препаратов, средств против иммунодефицита и ряда других болезней [1–3].

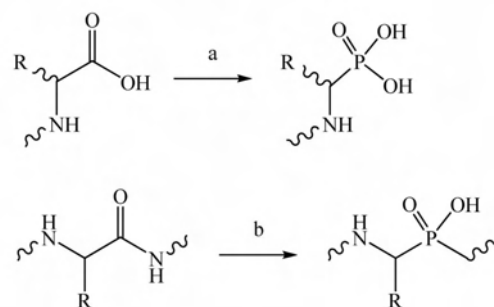


Рис. 1. Фосфоизостеры аминокислот и пептидов.

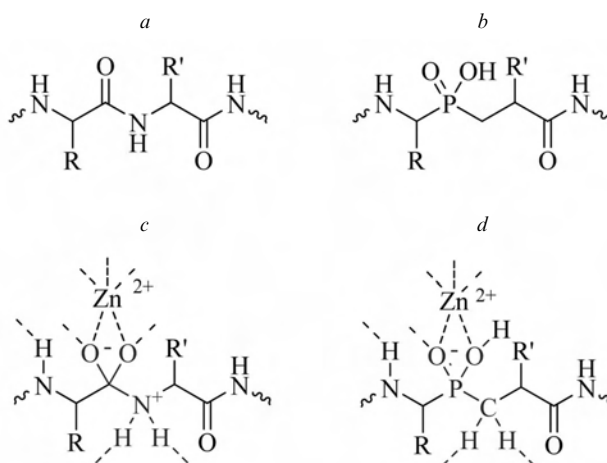


Рис. 2. Переходное состояние пептидного гидролиза.

*a* — фрагмент пептида; *b* — фосфиновый псевдо-пептид; *c* — переходное состояние гидролиза пептида с тетрагональным атомом углерода; *d* —  $Aa_1\text{-}\Psi[P(O)(OH)CH_2]\text{-}Aa_2$  ( $Aa$  — аминокислота).

**М.Э.Дмитриев.** Кандидат химических наук, научный сотрудник лаборатории фосфорорганических соединений ИФАВ РАН. e-mail: ipastax@gmail.com

**В.В.Рагулин.** Доктор химических наук, главный научный сотрудник той же лаборатории. e-mail: rvalery@dio.ru

Ингибиторы металлопротеиназ участвуют в ряде патологических состояний, таких как рост опухоли метастазов, рассеянный склероз, ревматоидный артрит, сердечная недостаточность и др. [2, 3]. Предложен синтез псевдо- $\gamma$ -глутамилпептидов, проявивших свойства агонистов mGlu4R (mGlu4R — метаболитные глутаматные рецепторы), что представляет безусловный интерес для лечения болезни Альцгеймера и для процессов запоминания информации [4, 5].

Заметный вклад в развитие методов синтеза фосфиновых кислот псевдо-пептидов и в решение проблем медико-биологического плана внесла интернациональная группа исследователей под руководством профессора А.Иотакиса [6–8]. Датская группа исследователей профессора М.Мелдала впервые предложила новые методы твердофазного синтеза с использованием N-Fmoc замещенных псевдо-дипептидов [9].

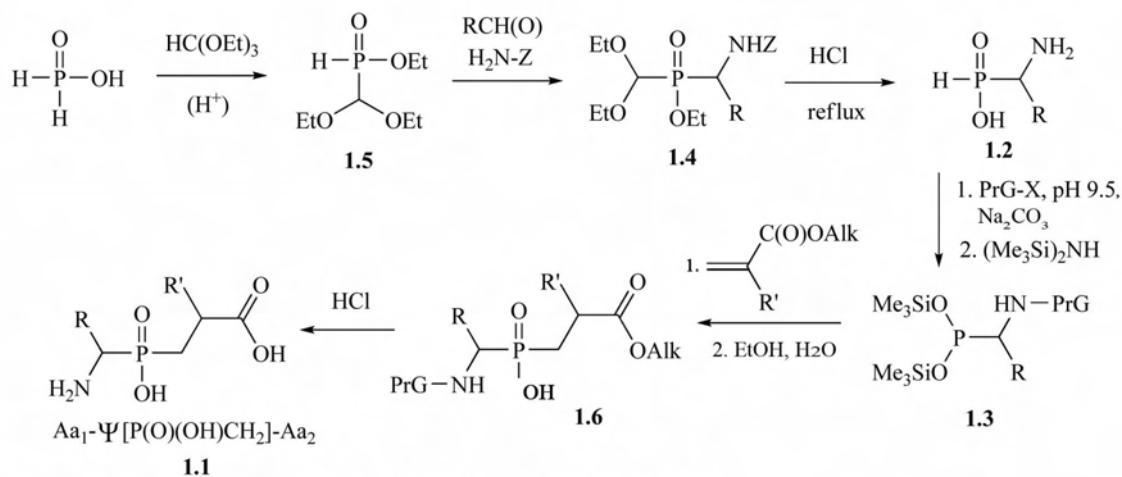
## 2. Методология синтеза фосфиновых псевдо-пептидов на основе фосфонистых аналогов аминокислот

Наиболее известный в настоящее время подход к синтезу фосфиновых псевдо-пептидов **1.1** (схема 1) основан на пионерском исследовании компании Ciba-Geigy (Novartis) (UK), посвященном разработке методов синтеза фосфонистых аналогов широкого ряда природных аминокислот **1.2** (см. схему 1) [10]. Построение аминокислотного блока **1.3** для последующего син-

теза пептида представляет собой процесс из четырех или более стадий, обусловленный постановкой и удалением защитных групп (PrG) при атомах фосфора {P-CH(OEt)<sub>2</sub>} и азота, например, (N-Cbz), в молекуле фосфината **1.4**, образующегося взаимодействием тритил- или дифенилметиламина, соответствующего альдегида и реактива Ciba-Geigy **1.5** в соответствии с реакцией Кабачника–Филдса [10].

Методология синтеза фосфиновых псевдо-пептидов, в основном используемая в настоящее время, заключается в последующем присоединении фосфонистых аналогов аминокислот к соответствующим образом  $\alpha$ -R'-замещенным акрилатам, представляющим собой соответствующий (в зависимости от R') структурный изостер второй аминокислотной составляющей дипептида [6–9]. В качестве наиболее эффективной обычно использовалась процедура присоединения силиловых эфиров N-защищенных аминокислотных фосфонистых кислот **1.3** к соответствующим образом  $\alpha$ -R'-замещенным акрилатам по Михаэлю–Пудовику с образованием псевдо-пептидного фрагмента псевдо-дипептида с сохранением эфирных групп и соответствующей защиты при атоме азота в молекуле фосфината **1.6** (см. схему 1). Гидролиз последнего приводит к фосфиновому структурному изостеру природного дипептида Aa<sub>1</sub>- $\Psi$ -[P(O)(OH)CH<sub>2</sub>]-Aa<sub>2</sub> в виде свободной аминокислотной кислоты **1.1**.

Схема 1. Синтез фосфиновых пептидов на основе исследований компании Ciba-Geigy (здесь и далее R и R' соответствуют радикалам в молекуле природной аминокислоты)



Z = Ph<sub>3</sub>C or Ph<sub>2</sub>CH; PrG = Ac, Cbz, Boc, Fmoc; X = Cl, OAc, BocO, ONSu



### 3. Развитие альтернативной методологии синтеза фосфиновых псевдо-пептидов на основе гипофосфитов

Основной проблемой в развитии методологии синтеза фосфоизостеров пептидов является создание двух несимметричных фосфор-углеродных связей аминокислотной функции, связывающей две аминокислотные составляющие молекулы фосфинового пептида. Исследования, проведенные в ИФАВ РАН [11–21], внесли определенный вклад в решение данной проблемы и развитие методологии синтеза псевдо-пептидов.

Мы предложили и развиваем другую идеологию синтеза, заключающуюся в обратном наиболее распространенному в литературе порядке построения целевой молекулы псевдо-пептида — первоначальном присоединении  $\text{P}^{\text{III}}$ -гипофосфористой компоненты **2.1** (схема 2) к соответствующим образом  $\alpha$ -замещенным акрилатам с образованием фосфонистых кислот **2.2**, содержащих структурный изостер соответствующей аминокислоты с последующим присоединением или построением амино- или аминокислотной функции и образованием фосфорильного аналога второй аминокислотной компоненты молекулы фосфоизостера дипептида **2.3**.

Эти исследования базируются на найденной нами в 1988 г. реакции последовательного формирования двух фосфор-углеродных связей путем двукратного превращения по типу реакции Арбузова последовательно генерируемых *in situ* силиловых эфиров трехвалентного фосфора с галогеналканами [11]. Дальнейшее исследование и развитие этой реакции, позднее названной двойной реакцией Арбузова, позволило создать новую методологию формирования двух несимметричных фосфор-углеродных связей [12–21]. Ключевым интермедиатом как двойной реакции Арбузова, так и образования несимметричных фосфиновых кислот, является бис(триметилси-

лил)гипофосфит (**BSH**) **2.1** (см. схему 2), генерируемый *in situ* из солей гипофосфористой кислоты. Это уникальное высокорекреационное соединение способно вступать в большое число реакций различного характера с образованием фосфор-углеродных связей, как в превращениях по типу реакций Арбузова или Кабачника–Филдса, так и в присоединении к активированным непредельным связям [12–21].

Первоначальное присоединение генерированного *in situ* бис(триметилсилил)гипофосфита (**BSH**) (схема 3) к соответствующим образом  $\alpha$ -замещенным акрилатам с образованием *первой* фосфор-углеродной связи дает прекрасную возможность последующего использования образующихся интермедиатов, фосфонистых кислот **3.1**, содержащих структурный изостер соответствующей аминокислоты ( $\text{CH}_2 \rightleftharpoons \text{NH}$ ), в дальнейших превращениях с целью формирования *второй* фосфор-углеродной связи и образования фосфиновых структурных изостеров природных дипептидов. Силилирование фосфонистых кислот **3.1** и последующее взаимодействие образующихся силилфосфонитов *in situ* с соответствующими  $\text{N}$ -( $\omega$ -бромалкил)фталимидами **3.2** по типу реакции Арбузова приводит к образованию фосфинатов **3.3**. Кислотный гидролиз последних дает  $\alpha$ -аминофосфиновые кислоты **3.4**, содержащие структурный изостер определенной аминокислоты, природа которой определяется соответствующим радикалом ( $\text{R}'$ ) в  $\alpha$ -положении к карбоновой функции. Ряд аминокислотных кислот **3.4** ( $n = 3$ ) являются структурными фосфиновыми изостерами дипептидов  $\gamma$ -аминомасляной кислоты (**GABA**) [17].

Взаимодействие генерированных *in situ* силилфосфонитов, легко образующихся нагреванием фосфонистых кислот **3.1** в гексаметилди-силазане, с избытком дибромэтана приводит к образованию силиловых эфиров 2-бромэтил-фосфиновых кислот **3.5**. Алкоголиз последних

Схема 2. Методология синтеза псевдо-пептидов с обратным построением целевой молекулы

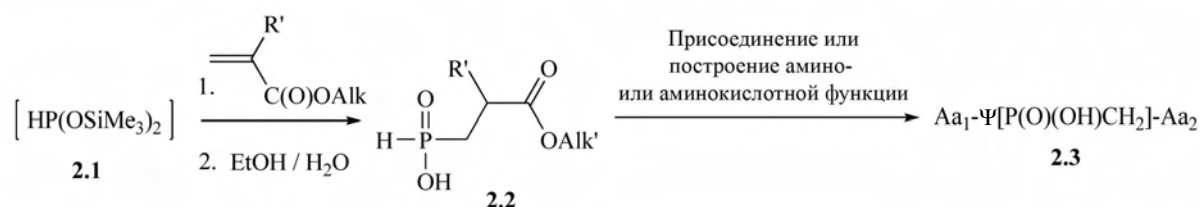
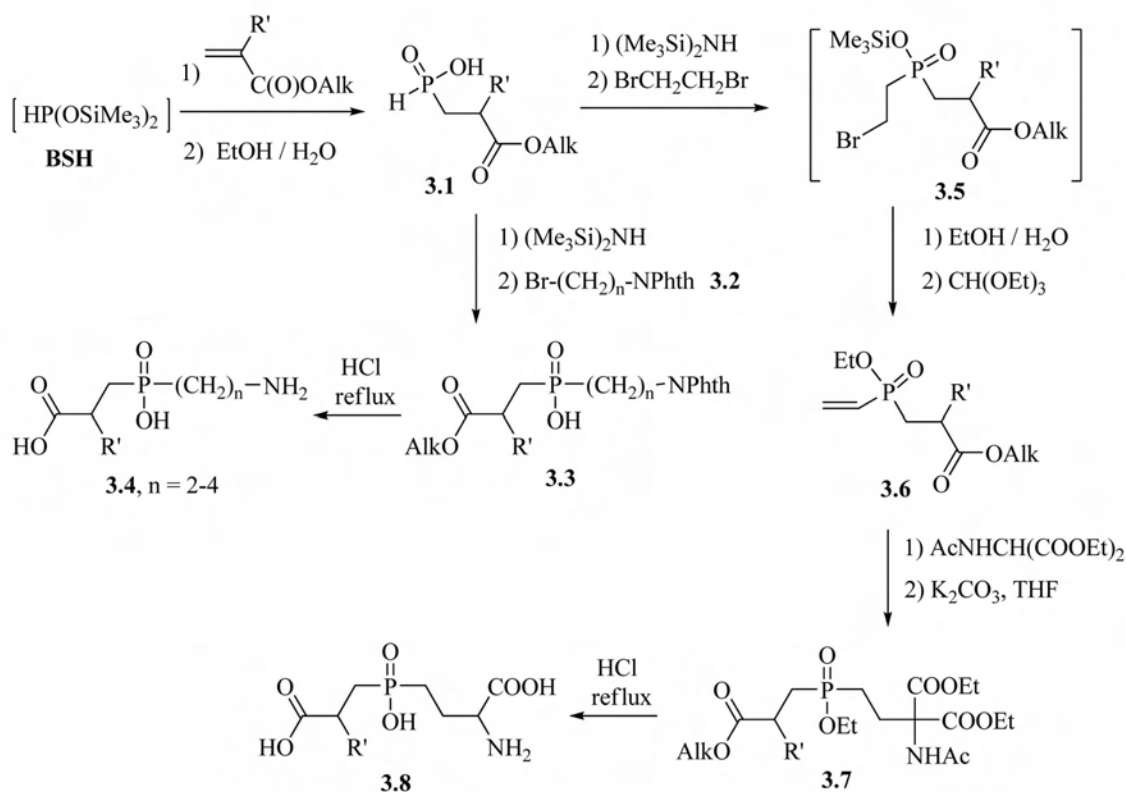


Схема 3. Синтез фосфиновых псевдо- $\gamma$ -бутаноилпептидов и псевдо- $\gamma$ -глутамилпептидов

дает соответствующие фосфиновые кислоты, которые обрабатываются избытком триэтилортоформиата. При этом одновременно с этерификацией кислотной функции происходит дегидробромирование [17–21] и с хорошими выходами образуются винилфосфинаты **3.6**, содержащие структурный изомерный фрагмент соответствующей аминокислоты. Последующее присоединение по Михаэлю ацетамидомалонового эфира создает фрагмент фосфорильного аналога глутаминовой кислоты в скрытой форме в молекуле фосфинатов **3.7**. Кислотный гидролиз последних приводит к образованию желаемых фосфиновых псевдо- $\gamma$ -глутамилпептидов **3.8** [18–21].

Таким образом, использование фосфонистых кислот **3.1** (см. схему 3), содержащих изомерный фрагмент соответствующей аминокислоты, позволяет осуществить присоединение или построение амино- или аминокислотной функции с использованием реакции Арбузова и последующей модификации с построением молекул фосфиновых кислот несимметричного строения — пептидных фосфоизомеров — псевдо- $\gamma$ -глутамилпептидов и псевдо- $\gamma$ -аминобутаноилпептидов [18–21].

Синтез фосфоизомеров  $\alpha,\alpha'$ -дипептидов, наиболее распространенной формы дипептидов, образованной двумя  $\alpha$ -аминокислотами, предполагает использование фосфонистых кислот **3.1** (см. схему 3), содержащих изомерный фрагмент соответствующей аминокислоты, в качестве гидрофосфорильной компоненты для построения  $\alpha$ -аминофосфорильной функции в соответствии с реакцией Кабачника–Филдса. Однако классическая версия этой трехкомпонентной реакции соответствующих аминов, карбонильных и гидрофосфорильных соединений оказалась в этом случае малоэффективной, особенно при использовании малореакционных легколетучих реагентов.

Поиск удобной и эффективной процедуры построения аминофосфорильной функции привел нас к исследованию ряда реакций, которые можно объединить как амидные версии реакции Кабачника–Филдса. Реакция амидоалкилирования была первоначально предложена для амидов, карбонильных соединений и хлоридов трехвалентного фосфора в уксусной кислоте (реакция Олексижина) [22–26]. Последующая ее модификация в процедуру амидоалкилирования диалкилфосфитов в ацетилхлориде или в смеси

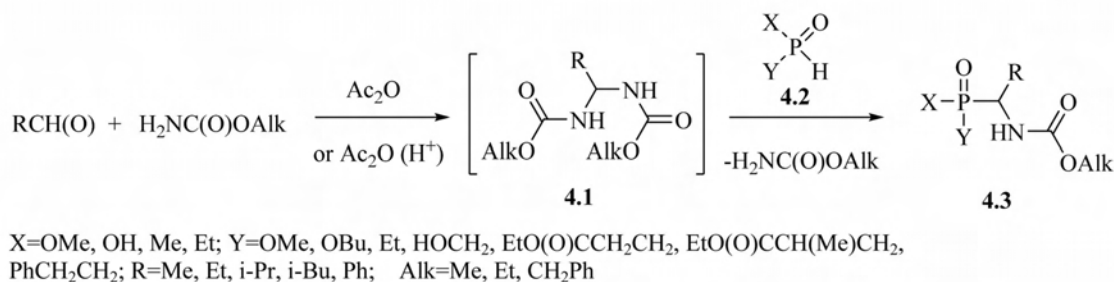
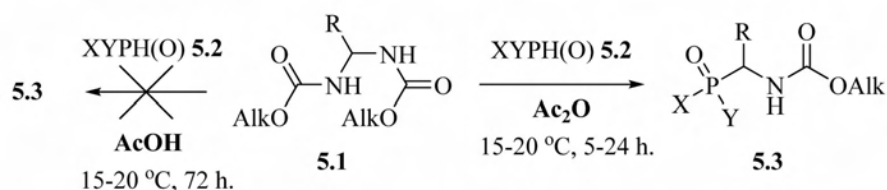
Схема 4. Общий метод синтеза  $\alpha$ -аминофосфорильных соединений

Схема 5. Исследование двухкомпонентного варианта реакции



В процессе изучения амидоалкилирования гидрофосфорильных соединений в среде уксусного ангидрида были впервые выделены алкилиденбискарбаматы **4.1** в качестве стабильных интерме-

датов этой реакции, взаимодействие которых с гидрофосфорильной компонентой **4.2** приводит к образованию N-защищенных  $\alpha$ -аминофосфорильных соединений **4.3** с хорошими выходами (схема 4), что позволяет осуществить двухкомпонентный вариант реакции в уксусном ангидриде на холоду (схема 5).

укусной кислоты и тионилхлорида с участием альдегидов или кетонов, амидов или карбаматов использовалась, однако широкого распространения не нашла, возможно, по причине заметного дезалкилирования эфирных фрагментов при атоме фосфора, а также значительного гидролиза других кислотнестойких функциональных групп [27–31].

Наши исследования позволили отметить пионерскую работу [32] с описанием трехкомпонентной процедуры синтеза свободных  $\alpha$ -аминофосфоновых кислот из фосфористой кислоты, амидов и карбонильных соединений в кипящем уксусном ангидриде с последующим кислотным гидролизом. Тщательное изучение амидной версии реакции Кабачника–Филдса в уксусном ангидриде позволило обнаружить высокую эффективность алкилкарбаматов по сравнению с амидами в этой реакции. Этот результат предопределил нашу возможность разработать и предложить эффективный общий метод построения N-защищенной аминофосфорильной функции.

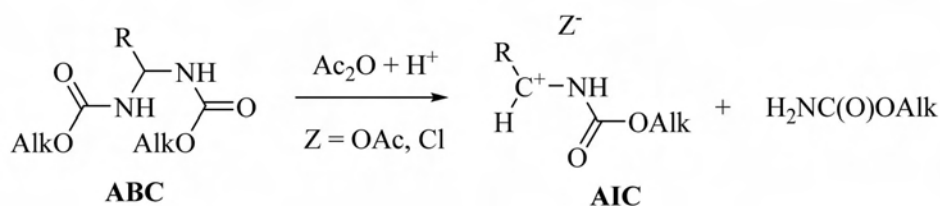
Мы нашли [33–35], что амидная версия реакции Кабачника–Филдса с использованием карбаматов, карбонильных соединений и гидрофосфорильных соединений является эффективной процедурой синтеза N-защищенных  $\alpha$ -аминофосфорильных соединений разнообразного строения в среде уксусного ангидрида при комнатной температуре.

Однако, дальнейшие исследования реакции показали, что интермедиат — алкилиденбискарбамат **5.1** и исходная P–H компонента **5.2** не взаимодействуют в уксусной кислоте, в то время как в уксусном ангидриде с хорошими выходами они дают целевые соединения **5.3** даже в отсутствие кислого катализа, хотя и более медленно, так как катализ в этом случае обеспечивается уксусной кислотой, образующейся при взаимодействии гидрофосфорильной компоненты с избытком уксусного ангидрида. При этом исходное P–H соединение превращается в  $\text{P}^{\text{III}}$ –OAc-производное трехкоординированного трехвалентного фосфора, которое непосредственно участвует в образовании целевой фосфор-углеродной связи в качестве нуклеофильной компоненты.

Результаты исследований позволили заключить, что электрофильной компонентой реакции является ацилиминиевый катион (AIC) (схема 6), генерируемый *in situ* из стабильного интермедиата реакции N,N'-алкилиденбискарбамата (ABC) [33–37].

Данные исследований позволили предложить новый механизм трехкомпонентной реак-

Схема 6. Механизм образования ацилиминиевого катиона (AIC)



ции амидоалкилирования гидрофосфорильных соединений, являющейся многостадийным процессом, включающим стадию образования бискарбаматов и последующую стадию образования фосфор-углеродной связи в соответствии с реакцией Арбузова в результате нуклеофильной атаки атома ацетилоксипроизводного трехвалентного фосфора (7.1) на положительно заряженный атом углерода иминиевого катиона (7.2) (схема 7), генерируемых *in situ* в условиях реакции соответственно из исходного гидрофосфорильного соединения и N,N'-алкилиденбис(алкилкарбамата).

Последующая атака аниона  $Z^-$  на электрофильный углерод POAc-фрагмента фосфониевого интермедиата (7.3) приводит к образованию целевого N-защищенного  $\alpha$ -аминофосфорильного соединения (7.4) с выделением AcZ (см. схему 7) в соответствии со второй стадией реакции Арбузова [33–38].

Таким образом, результаты наших исследований позволили предложить простой и эффективный способ построения молекул N-

защищенных аминокислот 8.1 и псевдо- $\alpha, \alpha'$ -дипептидов 8.2 (схема 8).

Мы нашли удобную процедуру амидоалкилирования фосфонистых кислот 8.3 (см. схему 8),

содержащих структурный изостер соответствующей аминокислоты, с использованием алкилкарбаматов 8.4 и соответствующих карбонильных соединений 8.5 в уксусном ангидриде при комнатной температуре, позволяющую получить достаточно широкий ряд различных N-защищенных фосфиновых псевдо-пептидов 8.1 с удовлетворительными и хорошими выходами [33–43].

#### 4. Заключение

Исследования амидоалкилирования гидрофосфорильных соединений, проведенные в ИФАВ РАН, внесли определенный вклад в развитие синтетического потенциала этой реакции, в изучение механизма образования фосфор-углеродной связи. Полученные результаты позволяют рассматривать незаслуженно забытый амидный вариант реакции Кабачника–Филдса высоко конкурентным в сравнении с классической версией реакции, и дают основание оценивать эту версию реакции как предпочтительный во многих аспектах метод синтеза N-защищенных

Схема 7. Механизм образования фосфор-углеродной связи

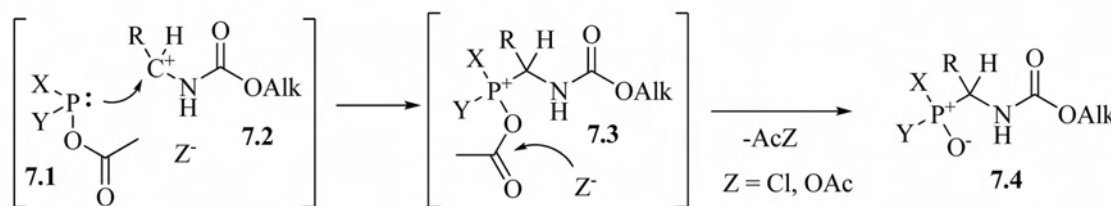
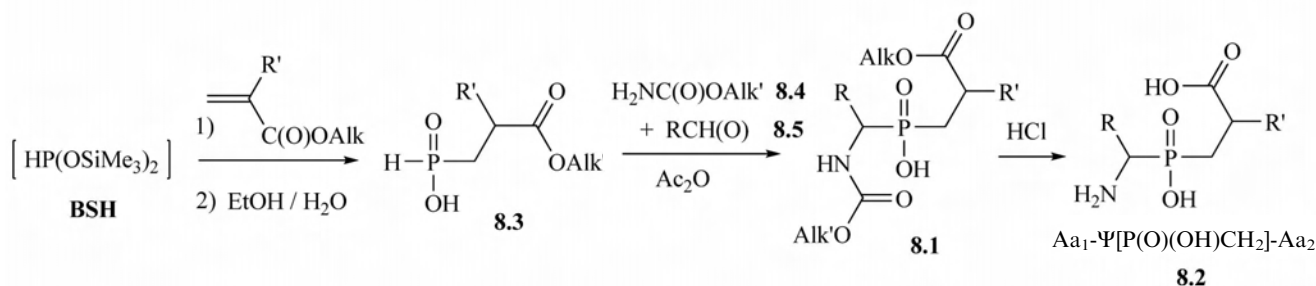


Схема 8. Методология синтеза псевдо-пептидов с обратным построением целевой молекулы (R и R' соответствуют радикалам в молекуле природной аминокислоты)



$\alpha$ -аминофосфорильных соединений разнообразного строения.

В процессе исследований была найдена уникальная по простоте общая процедура синтеза широкого ряда  $\alpha$ -аминофосфорильных соединений взаимодействием карбонильной, гидрофосфорильной компоненты и алкилкарбамата в среде уксусного ангидрида при комнатной температуре.

Таким образом, результаты исследований позволяют предложить альтернативную методологию синтеза фосфиновых изостеров природных дипептидов с обратным наиболее распространенному в литературе порядком построения целевой молекулы, как более короткий и более эффективный путь к фосфиновым псевдопептидам.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-03-00959).

## Литература

1. M.Collinsova, J.Jiracek. *Current Medicinal Chemistry*, **7** (6), 629–647 (2000)
2. A.Mucha. *Molecules*, **17**, 13530–13568 (2012)
3. O.S.Grigorkevich, G.V.Mokrov, A.S.Dyabina, V.N.Stolyaruk, I.B.Tsorin, E.O.Ionova, S.A.Kryzhanovskii, T.A.Gudasheva, A.D.Durnev. *Pharm. Chem. J.*, **52** (1), 8–14 (2018)
4. V.V.Ragulin, L.F.Rozhko, I.V.Saratovskikh, N.S.Zefirov. Patent of Japan 2000-18568 (2000)
5. C.Selvam, N.Oueslati, I.A.Lemasson, I.Brabet, D.Rigault, T.Courtiol, S.Cesarini, N.Triballeau, H.-O.Bertrand, C.Goudet, J.-P.Pin, F.C.Acher. *J. Med. Chem.*, **53** (7), 2797–2813 (2010)
6. D.Georgiadis, M.Matziari, A.Yiotakis. *Tetrahedron*, **57** (16), 3471–3478 (2001)
7. M.Matziari, F.Beau, P.Cuniassse, V.Dive, A.Yiotakis. *J. Med. Chem.*, **47** (2), 325–336 (2004)
8. V.Dive, D.Georgiadis, M.Matziari, A.Makaritis, F.Beau, P.Cuniassse, A.Yiotakis. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, **61** (16), 2010–2019 (2004)
9. J.Buchardt, M.Ferreras, C.Krog-Jensen, J.-M.Delaisse, N.T.Foged, M.Meldal. *Chem. Eur. J.*, **5** (10), 2877–2884 (1999)
10. E.K.Baylis, C.D.Campbell, J.G.Dingwall. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 2845–2853 (1984)
11. V.V.Ragulin, E.N.Tsvetkov. *Bulletin of the Academy of Sciences of the USSR, Division of Chemical Sciences*, **37** (11) 2393 (1988)
12. N.R.Kurdyumova, L.F.Rozhko, V.V.Ragulin, E.N.Tsvetkov. *Zhurnal Obshchei Khimii*, **67** (12), 1965–1969 (1997)
13. N.R.Kurdyumova, L.F.Rozhko, V.V.Ragulin, E.N.Tsvetkov. *Zhurnal Obshchei Khimii*, **67** (12), 1970–1973 (1997)
14. N.R.Kurdyumova, V.V.Ragulin, E.N.Tsvetkov. *Mendeleev Commun.*, (2), 69–70 (1997)
15. V.V.Ragulin, N.R.Kurdyumova, E.N.Tsvetkov. *Phosphorus, Sulfur and Silicon*, **88** (1–4), 271–274 (1994)
16. V.V.Ragulin, L.F.Rozhko, I.V.Saratovskikh, N.S.Zefirov. Patent of Japan 2000-18581 (2000)
17. V.V.Ragulin. *Russian Journal of General Chemistry*, **78** (9), 1655–1661 (2008)
18. L.F.Rozhko, V.V.Ragulin. *Amino Acids*, **29** (2), 139–143 (2005)
19. V.V.Ragulin. *Russian Journal of General Chemistry*, **71** (11), 1823–1824 (2001)
20. V.V.Ragulin. *Russian Journal of General Chemistry*, **74** (8), 1177–1181 (2004)
21. V.V.Ragulin. *Russian Journal of General Chemistry*, **77** (5), 861–865 (2007)
22. J.Oleksyszyn, R.Tyka, P.Mastalerz. *Synthesis*, (6), 479–480 (1978)
23. J.Oleksyszyn, L.Subotkowska, P.Mastalerz. *Synthesis*, (12), 985–986 (1979)
24. J.Oleksyszyn. *Synthesis*, (9), 722–724 (1980)
25. J.Oleksyszyn. *J. Prakt. Chem.*, **329** (1), 19–28 (1987)
26. J.Oleksyszyn, E.Gruszecka, P.Kafarski, P.Mastalerz. *Monatsh. Chem.*, **113** (1), 59–71 (1982)
27. C.Yuan, G.Wang, S.Chen. *Synthesis*, (6), 522–524 (1990)
28. C.Yuan, S.Chen, G.Wang. *Synthesis*, (6), 490–493 (1991)
29. C.Yuan, S.Chen. *Synthesis*, (11), 1124–1128 (1992)
30. S.Chen, J.K.Coward. *Tetrahedron Lett.*, **37** (25), 4335–4338 (1996)
31. S.-K.Chung, D.-H.Kang. *Tetrahedron: Asymmetry*, **7** (1), 21–24 (1996)
32. J.Oleksyszyn, E.Gruszecka. *Tetrahedron Lett.*, **22** (36), 3537–3540 (1981)
33. M.E.Dmitriev, V.V.Ragulin. *Tetrahedron Lett.*, **51** (19), 2613–2616 (2010)
34. M.E.Dmitriev, E.A.Rossinets, V.V.Ragulin. *Rus. J. Gen. Chem.*, **81** (6), 1092–1104 (2011)
35. M.E.Dmitriev, V.V.Ragulin. *Tetrahedron Lett.*, **53** (13), 1634–1636 (2012)
36. M.E.Dmitriev, V.V.Ragulin. *Rus. J. Gen. Chem.*, **82** (11), 1882–1885 (2012)
37. M.E.Dmitriev, V.V.Ragulin. *Rus. J. Gen. Chem.*, **83** (10), 1888–1894 (2013)
38. M.E.Dmitriev, L.L.Yurkova, S.A.Lermontov, V.V.Ragulin. *Rus. J. Gen. Chem.*, **85** (2), 497–499 (2015)
39. M.E.Dmitriev, V.V.Ragulin. *Rus. J. Gen. Chem.*, **85** (9), 2091–2098 (2015)
40. A.V.Vinyukov, M.E.Dmitriev, A.V.Afanas'ev, V.V.Ragulin, L.A.Andreeva, N.F.Myasoedov. *Rus. J. Gen. Chem.*, **87** (2), 266–269 (2017)
41. A.V.Vinyukov, M.E.Dmitriev, V.V.Ragulin. *Rus. J. Gen. Chem.*, **86** (12), 2717–2720 (2016)
42. M.E.Dmitriev, A.V.Vinyukov, B.V.Lednev, V.V.Ragulin. *Rus. J. Gen. Chem.*, **87** (10), 2489–2492 (2017)
43. M.E.Dmitriev, A.V.Vinyukov, A.N.Yarkevich, V.V.Ragulin. *Rus. J. Gen. Chem.*, **87** (12), 2898–2901 (2017)

# Модификация биологически активных амидов и аминов фторсодержащими гетероциклами

В.Б.Соколов, А.Ю.Аксиненко, Т.А.Епишина, Т.В.Горева

*Лаборатория синтеза физиологически активных веществ ИФАВ РАН*

## 1. Введение

Развитие новых оригинальных подходов к рациональному дизайну биологически активных веществ (БАВ) является одним из наиболее плодотворных направлений органической химии. Особенно привлекательна в этой связи задача функционализации БАВ фторсодержащими, в том числе гетероциклическими, заместителями, поскольку введением в молекулы БАВ фторсодержащих заместителей, как правило, не приводит к снижению биологической активности и вместе с тем придает молекуле уникальные физико-химические свойства, которые в свою очередь приводят к улучшению, и в ряде случаев, контролируемому изменению фармакологических параметров. К настоящему времени около 30% соединений, используемых в мировой медицинской практике или находящихся на стадии клинических исследований, содержат в том или ином виде атом фтора [1, 2]. Введение атомов фтора в органические молекулы, особенно в те их фрагменты, которые ответственны за биологическую активность, становится важным аспектом фармацевтических исследований, что в свою очередь стимулирует работы, направленные на поиск новых методологий синтеза самых разнообразных фторсодержащих соединений. Успехи в этой области в значительной степени связаны с разработкой доступных и эффективных методов

введения фторсодержащих, в том числе гетероциклических, заместителей в молекулы БАВ, осуществляемых с помощью высокоэлектрофильных фторсодержащих прекурсоров. В настоящей обзорной статье рассмотрены полученные нами данные о модификации разнообразных биологически активных амидов и аминов трифторметилсодержащими пяти- и шестичленными гетероциклами, основанные на систематическом изучении особенностей поведения *N*-замещенных иминов метилтрифторпирувата (МТФП) и гексафторацетона (ГФА) в циклоконденсации с 1,3-*C,N*-*C,O*- и *N,N*-бинуклеофилами и установлении синтетических возможностей применения этих реакций, для функционализации аминоксодержащих фармакофорных лигандов (схема 1) [3–22].

## 2. CF<sub>3</sub>-Содержащие гетероциклические производные стрептоцида

Сульфаниламидные препараты, несмотря на появление пенициллина и других антибиотиков, не потеряли своего значения и успешно используются для лечения инфекционных заболеваний. Вариация заместителей при сульфамидном атоме азота была и, по-видимому, будет основным подходом в молекулярном дизайне аналогов стрептоцида [23]. С этих позиций нами предложен синтетический подход к введению в молекулу стрептоцида по сульфамидному атому азота разнообразных фторсодержащих пятичленных гетероциклов, посредством мультикомпонентной реакции 4-*N*-ацетиламинобензолсульфамида **1**, метилтрифторпирувата **2** и 1,3-бинуклеофилов: метиловый эфир 3-пропиламинобут-2-еновой кислоты **4**, 4-(4-фторфениламино)пент-3-ен-2-он **5**, *N*-замещенные 3-аминоциклогексеноны **6a,b**, 6-аминоурацилы **7a,b** и **8**,

**В.Б.Соколов.** Кандидат химических наук, главный научный сотрудник, заведующий лабораторией синтеза физиологически активных веществ ИФАВ РАН.

**А.Ю.Аксиненко.** Кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник той же лаборатории.  
e-mail: alaks@ipac.ac.ru

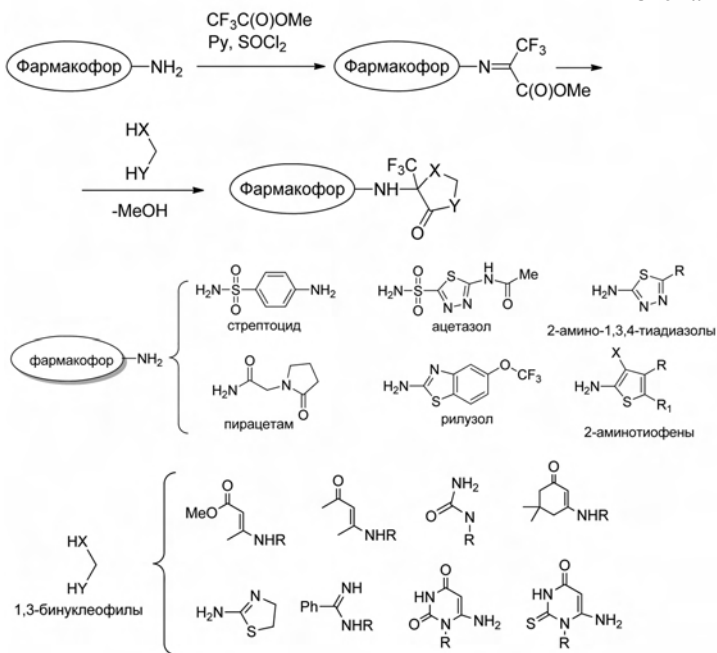
**Т.А.Епишина.** Научный сотрудник той же лаборатории.

**Т.В.Горева.** Научный сотрудник той же лаборатории.

*N*-замещенные мочевины **9a,b**. Синтез модифицированных стрептоцидов осуществляли методом «one-pot» последовательным прибавлением

к раствору 4-*N*-ацетиламинобензолсульфамида **1** в ДМФА эквимольных количеств пиридина, МТФП **2**,  $\text{SOCl}_2$  (в результате чего *in situ* генерируется 4-*N*-ацетиламинобензолсульфонилимин МТФП **3**), 1,3-бинуклеофила и после непродолжительного нагревания 10%-ный раствор  $\text{HCl}$  (схема 2) [4].

Схема 1

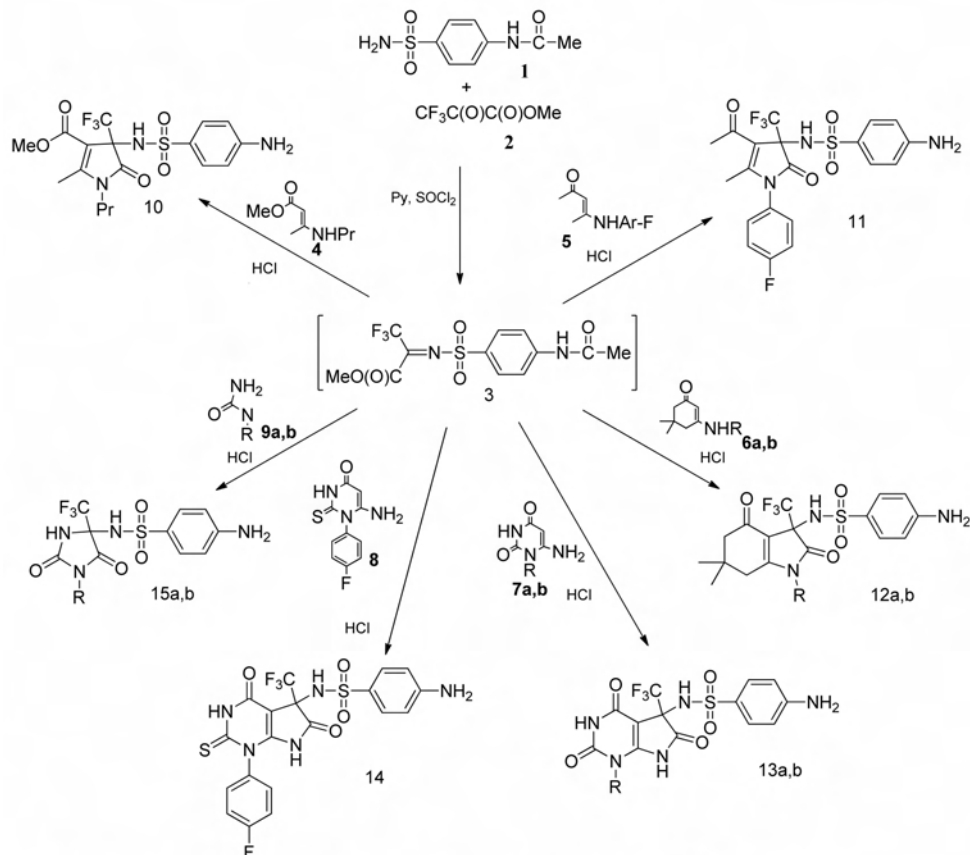


Данные по антимикробной активности соединений **10–15**, в отношении *S. aureus*, *S. enteritidis*, *B. anthracis* и *E. coli*, полученные методом «диффузии в агаре» показали в ряде случаев существенное увеличение активности, особенно для **12a,b**, по сравнению с базовой структурой — стрептоцидом (табл. 1) [4].

### 3. CF<sub>3</sub>-Содержащие гетероциклические производные ацетазоламида

Ацетазоламид — (N-(5-сульфамойл-[1,3,4]-тиадиазол-2-ил)ацетамид **16** является одним из эффективных ингибиторов карбоангидразы, применяемых при консервативном лечении внутричерепной гипер-

Схема 2



**6, 12:** R = C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> (**a**), 4-F-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>CH<sub>2</sub> (**b**); **7, 13:** R = CH<sub>3</sub> (**a**), 4-CH<sub>3</sub>O-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub> (**b**);

**9, 15:** R = 3-Cl-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub> (**a**), 3,4-(CH<sub>3</sub>O)<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> (**b**)

**Таблица 1.** Антибактериальная и противогрибковая активность трифторметилсодержащих *N*-гетерил-4-аминобензолсульфамидов **10–15**.

Соединение	Конц, %	Зоны задержки роста, мм				
		(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
стрептоцид	1.0	51	58	11	11	38
	0.1	35	29	0	0	30
	0.01	22	18	0	0	20
<b>10</b>	1.0	0	0	12	13	0
	0.1	0	0	0	0	16
	0.01	0	0	0	0	25
<b>11</b>	1.0	0	0	0	13	0
	0.1	0	0	0	16	0
	0.01	0	0	0	25	0
<b>12a</b>	1.0	0	0	69	19	25
	0.1	0	0	19	12	20
	0.01	0	0	0	0	19
<b>12b</b>	1.0	11	11	12	17	12
	0.1	0	0	0	29	0
	0.01	0	0	0	30	0
<b>13b</b>	1.0	12	13	24	19	12
	0.1	11	15	16	12	11
	0.01	0	11	0	11	0
<b>14</b>	1.0	16	32	19	17	17
	0.1	12	16	13	11	15
	0.01	0	0	11	0	0
<b>15a</b>	1.0	18	18	17	27	17
	0.1	11	11	12	19	15
	0.01	0	0	0	0	0
<b>15b</b>	1.0	11	12	13	13	11
	0.1	0	0	0	34	0
	0.01	0	0	0	44	0

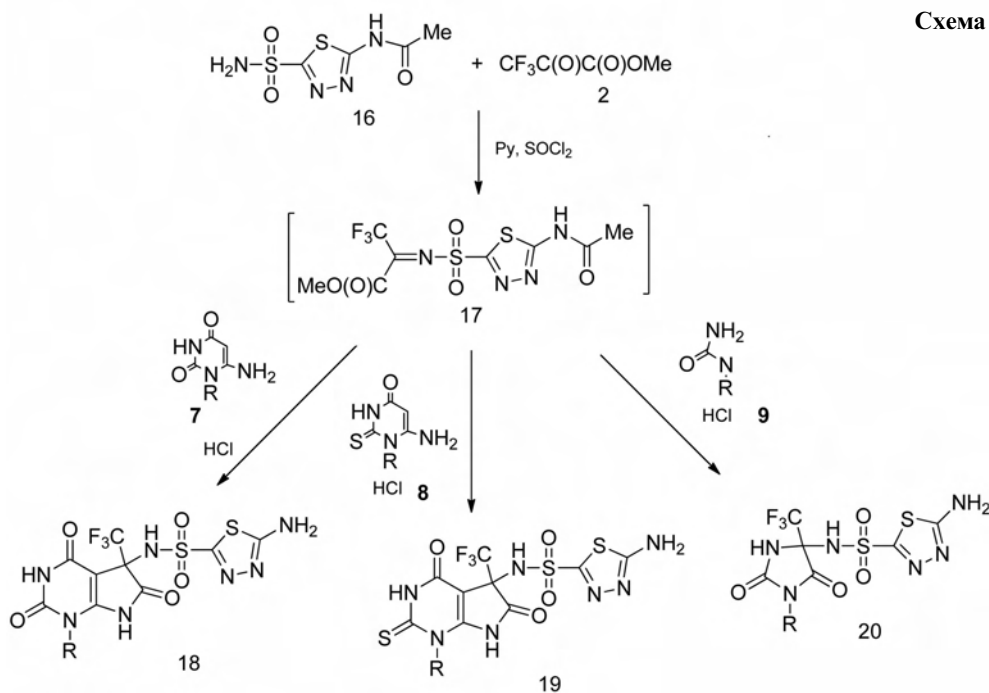
**Примечание.** Микроорганизм: (1) — *S. aureus*, (2) — *S. enteritidis*, (3) — *B. anthracis*, (4) — *Candida*, (5) — *E. coli*.

тензии и гидроцефалии [23, 24]. Для улучшения фармакокинетических характеристик ацетазоламида проведена его модификация трифторметилсодержащими пятичленными гетероциклами посредством мультикомпонентной реакции **16** с метилтрифторпируватом (МФТП) **2** и 1,3-бинуклеофилами.

В связи с тем, что получить исходный электрофильный синтон — сульфонилимин МФТП **17** в индивидуальном состоянии, используя известные в литературе методы синтеза *N*-замещенных иминов МФТП, не удалось, имин **17** генерировали *in situ* последовательным прибавлением к раствору сульфида **16** в ДМФА пиридина, МФТП **2** и тионилхлорида и последующим вовлечением **17** без выделения в индивидуальном состоянии в циклоконденсацию с 1,3-бинуклеофилами. Взаимодействие имида **17** с 1,3-бинуклеофилами осуществляется по механизму реакции циклоконденсации: присоединение бинуклеофила по высокорекреационноспособной C=N-связи с последующей гетероциклизацией с элиминированием метанола. В этих превращениях в качестве 1,3-бинуклеофилов изучены 6-аминоурацилы **7**, 6-аминотиоурацилы **8** и *N*-замещенные мочевины **9**. Циклоконденсация **17** с **7–9** приводит к образованию соответствующих гетероциклических производных ацетазоламида **18–20** (схема 3) [13].

Таким образом, трехкомпонентная реакция

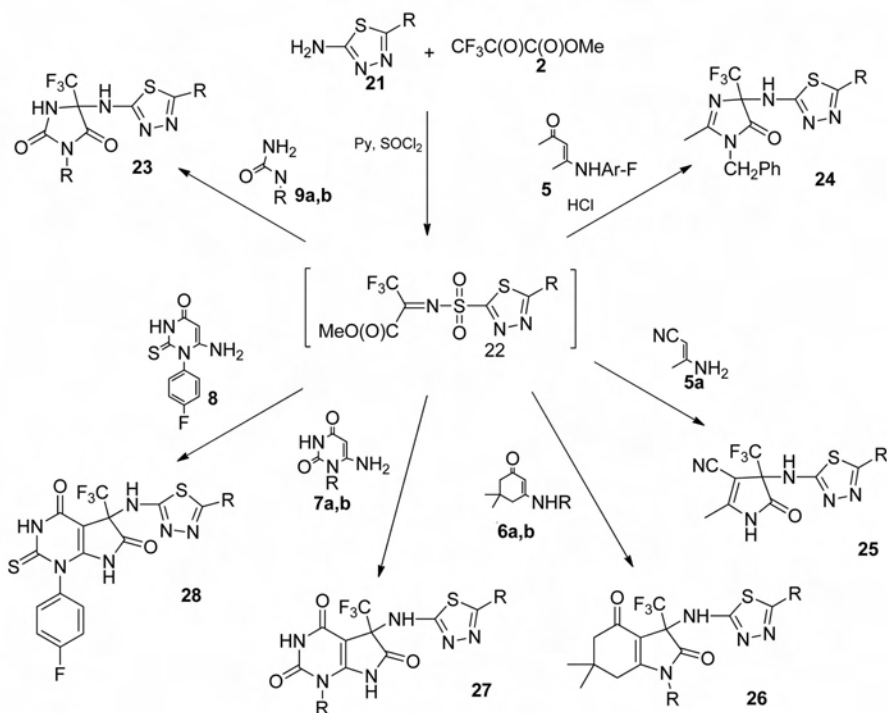
**Схема 3**



*N*-(5-сульфамойл-[1,3,4]тиадиазол-2-ил)-ацетамида, МФТП и 1,3-бинуклеофилов приводит к новым фторсодержащим гетероциклическим производным ацетазоламида и является перспективным подходом к молекулярному дизайну этого диуретика. При последующем гидролизе продуктов циклоконденсации образуются фторсодержащие гетероциклические производные 5-ами-



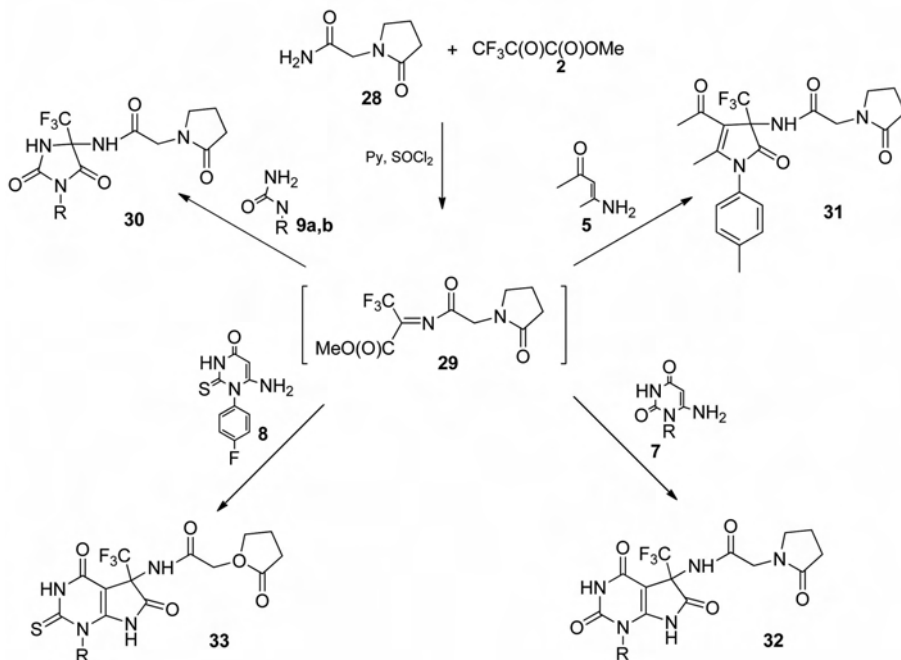
Схема 4



#### 4. CF<sub>3</sub>-Содержащие гетероциклические производные 2-амино-1,3,4-тиадиазолов

Производные 1,3,4-тиадиазолов используют в агрохимической, например, в качестве гербицидов [25] и фунгицидов [26] и медицинской практике, например, бактерициды [27]. Модификацию 2-амино-1,3,4-тиадиазолов трифторметилсодержащими пятичленными гетероциклами, как и в случае стрептоцида осуществляли мультикомпонентной реакцией 2-амино-1,3,4-тиадиазолов **21** с метилтрифторпируватом **1** и 1,3-*N,N*- и 1,3-*C,N*-бинуклеофилами, приводящей к образованию соответствующих производных **23–28** (схема 4) [9].

Схема 5



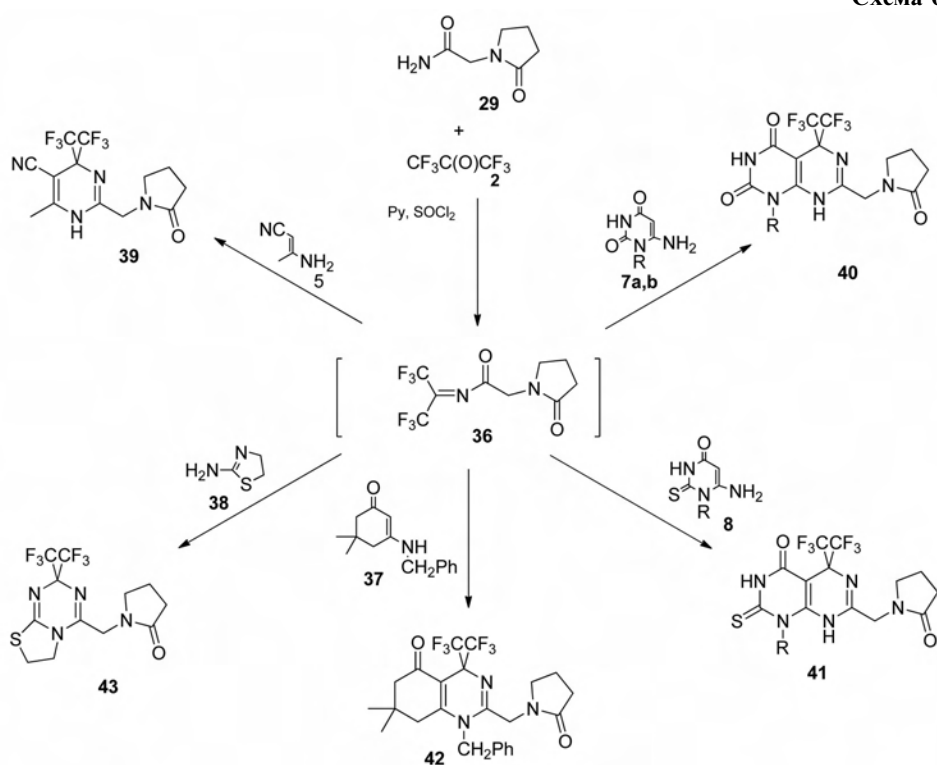
4, 8: R = cyclo-C<sub>5</sub>H<sub>9</sub> (a); PhCH<sub>2</sub> (b); 6, 10: R = PhCH<sub>2</sub> (a); PhCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> (b); 3,4-(MeO)<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> (c); Furyl-CH<sub>2</sub> (d); 7, 11: R = Ph (a); 3-Me-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub> (b)

#### 5. CF<sub>3</sub>-Содержащие гетероциклические производные пирацетама

Пирацетам — ноотропный препарат метаболитного действия широко используемый для лечения различных заболеваний нервной системы [23], причем последнее поколение ноотропов представляют собой различные варианты модификации базовой структуры — пирацетама путем введения различных заместителей в 2-оксопирролидин-1-ильный фрагмент и по амидному атому азота [28]. Наличие амидного фрагмента в молекуле позволяет провести мо-

но[1,3,4]тиадиазол-2-сульфо кислоты — потенциальные антибактериальные сульфамидные вещества.

дификацию рассматриваемого ноотропа как пятичленными (генерируя *in situ* 2-(2-оксопирролидин-1-ил)ацетилимин МТФП), так и шести-



членными (генерируя *in situ* 2-(2-оксопирролидин-1-ил)ацетилимин ГФА) гетероциклами. Так мультикомпонентной реакцией пираретама **28** с МТФП **2** и 1,3-*N,N*- и *C,N*-бинуклеофилами **5**, **7–9** получены трифторметилгетерилпроизводные **30–33** (схема 5) [6].

Мультикомпонентной реакцией пираретама **30**, ГФА **2** и *C,N*-бинуклеофилами **5**, **7**, **8**, **37**, **38** проведена эндоциклическая модификация пираретама с включением амидной триады в бис-трифторметилсодержащую шестичленную гетероциклическую систему и получены производные **39–43** (схема 6) [7].

## 6. CF<sub>3</sub>-Содержащие гетероциклические производные рилузола

К настоящему времени единственным препаратом, достоверно замедляющим прогрессирование БАС является Рилузол — 6-трифторметоксибензотиазол-2-иламин **44**, терапевтический эффект которого, в том числе основан на ингибировании высвобождения глутамата, что приводит к уменьшению повреждения двига-

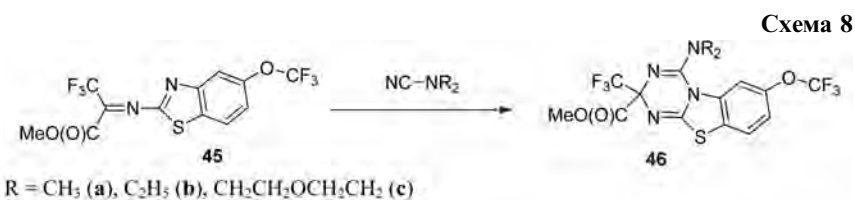
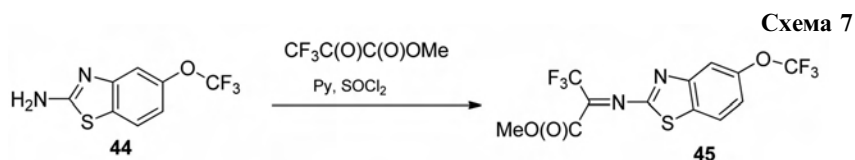
тельных нейронов [29]. Мы провели эндо- и экзоциклическое декорирование Рилузола трифторметилсодержащими пяти- и шестичленными гетероциклами [21].

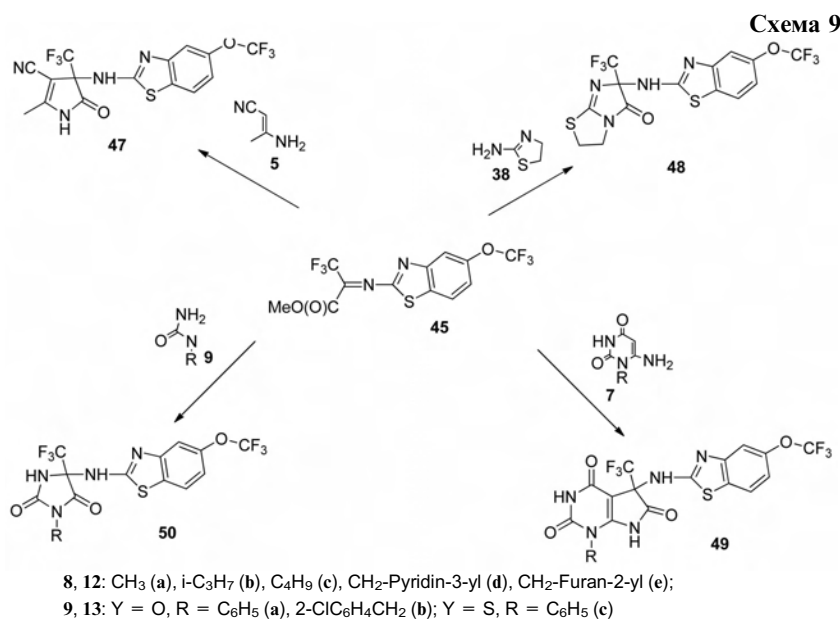
В качестве прекурсоров синтеза производных Рилузола получены ранее неизвестные *N*-6-трифторметоксибензотиазол-2-илимин МТФП **45** с использованием one-pot-методики последовательным прибавлением к раствору **1** в бензоле пиридина, МТФП **2a** или ГФА **2b** и SOCl<sub>2</sub> (схема 7).

Наличие в молекулах имида **45** азадиенового фрагмента позволило вовлечь эти соединения в

азареакцию Дильса–Альдера. Имин **45**, проявляя свойства электроноакцепторных гетеродиенов, при кипячении в бензоле взаимодействуют с электронодонорными диенофилами — цианаминами, образуя триазафлюорены **46** (схема 8).

Для получения производных Рилузола, модифицированных по экзоциклическому атому азота изучены превращения имида **45** в реакции циклоконденсации с 1,3-бинуклеофильными реагентами: нитрилом 2-аминокроновой кислоты **5**, 2-аминотиазолином **38**, *N*-замещенными мочевиными **9** и 6-аминоурацилами **7**. Имин **3a** экзотермично взаимодействует с **5** и **38**, образуя





соответственно дигидро-1*H*-пиррол **47** и дигидро-6*H*-имидазо[2,1-*b*]тиазол-5-он **11** (см. схему 9).

Изучение биологической активности синтезированных соединений, показало, способность этих соединений влиять на процессы высвобождения и обратного захвата меченного [<sup>3</sup>H]глутамата препаратами синапсом, и как следствие на транспорт глутамата, нарушение которого является одной из основных причин развития БАС [21].

## 7. CF<sub>3</sub>-Содержащие гетероциклические производные 2-аминотиофенов

Замещенные 2-аминотиофены, методом синтеза которых является реакция Гевальда [30], представляют класс перспективных биологически ак-

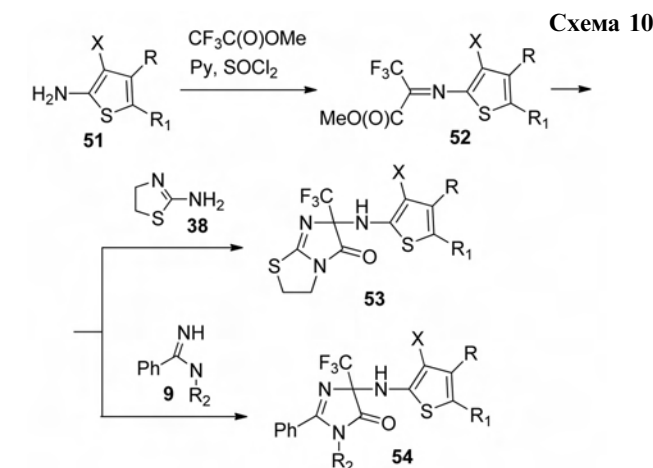
тивных веществ, используемых в медицинской и агрохимической практике [31, 32]. Основными подходами к молекулярному дизайну 2-аминотиофенов являются введение заместителей, в том числе трифторметилсодержащих в тиофеновый цикл [33], включение 2-аминотиофенового фрагмента в гетероциклическую систему [34], модификация различных заместителей при аминогруппе [35]. Нами проведена модификация 2-аминотиофенов фторсодержащими гетероциклами по аминогруппе посредством конденсации 2-аминотиофенов **51** с метилтрифторпируватом **2** (МТФП) и последую-

щей циклоконденсацией образующихся тиофен-2-илиминов метилтрифторпирувата **52** с 2-аминотиазолином **38** и бензамидинами **9** (схема 10) [5].

В результате экзотермичных реакций образуются трифторметилгетерилпроизводные 2-аминотиофенов **53** и **54**, причем предложенный синтетический подход к модификации 2-аминотиофенов позволяет сочетать в одной молекуле два биологически активных фрагмента: 2-аминотиофеновый и гетероциклический, содержащий фармакофорный структурный фрагмент 3,3,3-трифтораланина, обладающего высокой бактериостатической активностью [36].

## 8. Заключение

Таким образом обобщены изученные нами синтетические возможности иминов МТФП и ГФА, полученных на основе биологически активных аминов и аминокетонных производных: стрептоцида, ацетазоламида, 2-амино-1,3,4-тиадиазолов, парацетама, рилузола и 2-аминотиофенов для модификации базовых структур в реакциях циклоконденсации с *C,N*- и *N,N*-бинуклеофилами: производными аминокетонной кислоты, 6-аминоурацилами, 6-аминотиоурацилами, 2-аминотиазолинами, мочевидами и бензамидинами. Предложенный нами подход, по-видимому, можно считать достаточно перспективным для модификации биологически активных амидов и аминов трифторметилсодержащими пятичленными и бис-



трифторметилсодержащими шестичленными гетероциклами.

## Литература

1. D.O.Hagan. *Chem. Soc. Rev.*, **37**, 308–319 (2008)
2. J.Wang, M.Sánchez-Roselly, J.L.Aceca, C.del Pozo, A.E.Sorochinsky, S.Fustero, V.A.Soloshonok, H.Liu. *Chem. Rev.*, **114** (4), 2432–2506 (2014)
3. В.Б.Соколов, А.Ю.Аксиненко. *Журн. общ. химии*, **80** (1), 117–122 (2010)
4. В.Б.Соколов, А.Ю.Аксиненко, Т.А.Епишина, Т.В.Горева, И.В.Мартынов. *Изв. АН. Сер. хим.*, **1**, 188–192 (2010)
5. В.Б.Соколов, А.Ю.Аксиненко. *Изв. АН. Сер. хим.*, **1**, 193–195 (2010).
6. В.Б.Соколов, А.Ю.Аксиненко, Т.А.Епишина, Т.В.Горева, И.В.Мартынов. *Изв. АН. Сер. хим.*, **1**, 281–283 (2010)
7. В.Б.Соколов, А.Ю.Аксиненко, Т.А.Епишина, Т.В.Горева, И.В.Мартынов. *Изв. АН. Сер. хим.*, **4**, 845–847 (2010)
8. В.Б.Соколов, А.Ю.Аксиненко. *Журн. общ. химии*, **81** (5), 847–849 (2011)
9. В.Б.Соколов, А.Ю.Аксиненко, Т.А.Епишина, Т.В.Горева, И.В.Мартынов. *Изв. АН. Сер. хим.*, **4**, 693–697 (2011)
10. В.Б.Соколов, А.Ю.Аксиненко. *Журн. общ. химии*, **82** (6), 1046–1048 (2012)
11. В.Б.Соколов, А.Ю.Аксиненко. *Журн. общ. химии*, **82** (4), 756–758 (2012)
12. В.Б.Соколов, А.Ю.Аксиненко. *Изв. АН. Сер. хим.*, **11**, 2120–2122 (2012)
13. В.Б.Соколов, А.Ю.Аксиненко. *Изв. АН. Сер. хим.*, **11**, 2108–2111 (2012)
14. В.Б.Соколов, А.Ю.Аксиненко, Т.А.Епишина, Т.В.Горева, И.В.Мартынов. *Изв. АН. Сер. хим.*, **2**, 455–456 (2013)
15. В.Б.Соколов, А.Ю.Аксиненко, Т.А.Епишина, Т.В.Горева, И.В.Мартынов. *Докл. АН*, **448** (3), 310–311 (2013)
16. В.Б.Соколов, А.Ю.Аксиненко, Т.А.Епишина, Т.В.Горева. *Химия гетероцикл. соединений*, **3**, 468–473 (2013)
17. В.Б.Соколов, А.Ю.Аксиненко. *Журн. общ. химии*, **84** (3), 518–520 (2014)
18. В.Б.Соколов, А.Ю.Аксиненко, И.В.Мартынов. *Журн. общ. химии*, **84** (1), 90–92 (2014)
19. В.Б.Соколов, А.Ю.Аксиненко, Т.А.Епишина, Т.В.Горева. *Журн. общ. химии*, **84** (7), 1163 (2014)
20. A.Yu.Aksinenko, T.V.Goreva, T.A.Epishina, S.V.Trepalin, V.B.Sokolov. *J. Fluor. Chem.*, **188**, 191–195 (2016)
21. В.Б.Соколов, А.Ю.Аксиненко, А.В.Соколов, А.В.Габрельян, А.Д.Ефимова, В.В.Григорьев. *Изв. АН. Сер. хим.*, **1**, 99–103 (2017)
22. A.Yu.Aksinenko, T.V.Goreva, T.A.Epishina, S.V.Trepalin, V.B.Sokolov. *J. Fluor. Chem.*, **201**, 19–23 (2017)
23. М. А. Машковский. *Лекарственные средства*. Медицина, Москва, 1994.
24. I.Sibon, I.Ghorayer, P.Henry. *Neurology*, **61** (8), 1157–1158 (2003)
25. G.Y.Jin, Z.Hou, G.F.Zhao, C.Y.Cao, C.Li. *Chem. J. Chin. Univ.*, **18** (3), 409–412 (1997)
26. S.M.Lu, R.Y.Chen. *Org. Prep. Proced. Int.*, **32** (3), 302–306 (2000)
27. X.P.Hui, L.M.Zhang, Z.Y.Zhang, Q.Wang, F.Wang. *Indian J. Chem., Sect. B*, **38** (9), 1066–1069 (1999)
28. С.О.Бачурин. *Медицинская химия направленного поиска препаратов для лечения и предупреждения нейродегенеративных заболеваний на примере болезни Альцгеймера*. В кн. *Нейродегенеративные болезни и старение*. Москва, 2001, С. 399
29. В.И.Скворцова, С.О.Бачурин, О.Д.Разинская, А.П.Смирнов, Е.А.Ковражкина, К.И.Почигаева, Н.Н.Нинкина, Т.А.Шелковникова, А.А.Устюгов. *Журнал неврологии и психиатрии*, **111** (2), 4–9 (2011)
30. K.Gewald. *Chem. Ber.*, **98** (11), 3571–3577 (1965)
31. G.Nikolakopoulos, H.Figler, J.Linden, P.Scammells. *Bioorg. Med. Chem.*, **14** (7), 2358–2365 (2006)
32. A.D.Pillai, S.Rani, P.R.Rathod, F.P.Xavier, K.K.Vasu, H.Padh, V.Sudarsanam. *Bioorg. Med. Chem.*, **13** (4), 1275–1283 (2005)
33. L.Aurelio, H.Figler, B.L.Flynn, J.Linden, P.J.Scammells. *Bioorg. Med. Chem.*, **16** (3), 1319–1327 (2008)
34. A.Davoodnia, H.Behmadi, A.Zare Bidaki, M.Bakavoli, N.Tavakoli Hoseini. *Chinese Chem. Lett.*, **18** (10), 1163–1165 (2007)
35. R.J.Patch, C.A.Baumann, J.Liu, A.C.Gibbs, H.Ott, J.Lattanze, M.R.Player. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **16** (12), 3282–3286 (2006)
36. C.W.Fearon, J.A.Rodkey, R.H.Abeles. *Biochemistry*, **21** (16), 3790–3794 (1982)

## Производные (3.2.2)циклазин-1,2-дикарбоновых кислот — перспективные макроциклические предшественники

А.С.Стариков,<sup>1</sup> Ф.Е.Журкин,<sup>2</sup> В.В.Калашников,<sup>1</sup> Л.Г.Томилова,<sup>1,3</sup>  
В.Е.Пушкарев<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> *Институт физиологически активных веществ Российской академии наук*

<sup>2</sup> *Институт химических наук и инженерии Федерального института технологии Лозанны, Швейцария*

<sup>3</sup> *МГУ им. М.В.Ломоносова, Химический факультет*

Одной из актуальных задач современных исследований химии макрогетероциклов является получение доступных и химически устойчивых соединений, поглощающих в ближней ИК-области [1]. Эти требования могут быть выполнены в случае  $\pi$ -расширенных тетрапиррольных производных (порфиринов, фталоцианинов, нафталоцианинов и т.д.) как планарного, так и сэндвичевого строения [2].

(3.2.2)Циклазины представляют собой гетероциклы с третичным внутренним атомом азота и обладают расширенной 10- $\pi$  электронной системой сопряжения, что делает их интересными кандидатами для получения соответствующих аннелированных порфиразинов. Макроциклы на основе (3.2.2)циклазинов встречаются крайне редко [3], хотя могут проявлять ряд полезных свойств, прежде всего, поглощение в

ближней ИК-области. В качестве эффективных предшественников такого рода аннелированных порфиразинов могут быть использованы функциональные производные (3.2.2)циклазин-1,2-дикарбоновой кислоты (рис. 1).

Данные соединения распространены не так широко, как производные фталево́й кислоты, которые являются предшественниками таких известных макроциклических соединений как фталоцианины. Таким образом, синтез производных циклазин-1,2-дикарбоновых кислот и их дальнейшие превращения, включая потенциальную макроциклизацию, на настоящий момент представляют весьма актуальную и наукоемкую задачу.

Основными предшественниками (3.2.2)циклазин-1,2-дикарбоновых кислот являются соответствующие диэфиры, главный метод синтеза которых — это реакция [2 + 8]-циклоприсоединения с участием диметилацетилендикарбоксилата (DMAD) и соответствующих индолизинов в присутствии палладия на угле. Выходы данной реакции колеблются в весьма широких пределах (как правило, от 15 до 85%), в большинстве случаев приближаясь к 50%. В качестве примера на схеме 1 приведена реакция с участием незамещенного индолизина [4].

Стоит отметить, что наличие хорошей уходя-

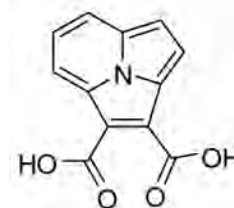


Рис. 1. (3.2.2)Циклазин-1,2-дикарбоновая кислота.

**А.С.Стариков.** Младший научный сотрудник лаборатории фталоцианинов и их аналогов ИФАВ РАН.

e-mail: andreistarikov1994@mail.ru

**Ф.Е.Журкин.** D.Sci, сотрудник Института химических наук и инженерии Федерального института технологии Лозанны. e-mail: fedor.zhurkin@epfl.ch

**В.В.Калашников.** Кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории фталоцианинов и их аналогов ИФАВ РАН. e-mail: kalashn2000@mail.ru

**Л.Г.Томилова.** Доктор химических наук, главный научный сотрудник лаборатории фталоцианинов и их аналогов, профессор Химического факультета МГУ

им. М.В.Ломоносова. e-mail: tom@org.chem.msu.ru

**В.Е.Пушкарев.** Доктор химических наук, главный научный сотрудник, заведующий лабораторией фталоцианинов и их аналогов ИФАВ РАН.

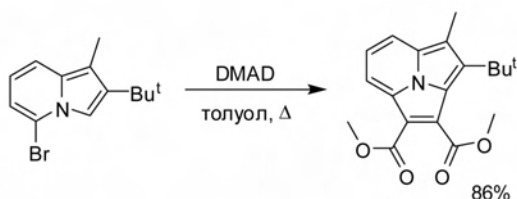
e-mail: pushkarev@ipac.ac.ru

**Схема 1.** Синтез незамещенного 1,2-дикарбометокси(3.2.2)циклазина

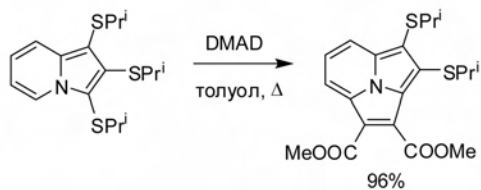


щей группы в положениях 3 или 5 индолизина позволяет проводить реакцию циклоприсоединения без катализатора, т.к. ароматизация происходит не за счет отщепления молекулы водорода, а за счет отщепления молекулы НХ (Х — уходящая группа). Выходы диэфиров при этом могут приближаться к количественным (схемы 2, 3) [5, 6].

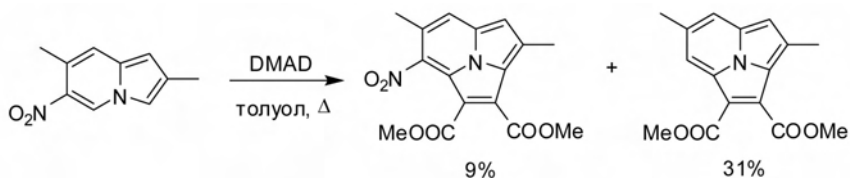
**Схема 2.** Пример синтеза 1,2-дикарбометокси(3.2.2)-циклазина с элиминированием молекулы НВr



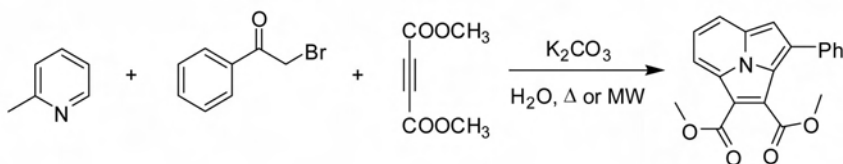
**Схема 3.** Пример синтеза 1,2-дикарбометокси(3.2.2)циклазина с элиминированием молекулы алкилтиола



**Схема 4.** Пример синтеза 1,2-дикарбометокси(3.2.2)циклазина с участием 6-нитрозамещенного индолизина



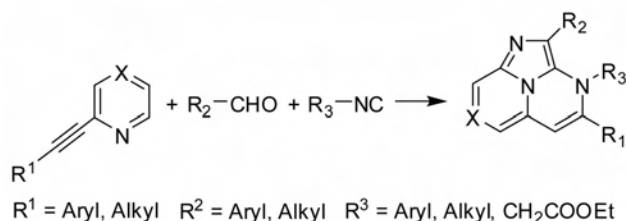
**Схема 6.** Синтез 3-фенил-1,2-дикарбометокси(3.2.2)циклазина в водной среде



Присутствие уходящей группы Х вне положений 3 и 5 индолизинового кольца, непосредственно участвующих в образовании нового цикла, может приводить к образованию смеси циклазинов, содержащих и не содержащих Х (схема 4) [7].

В последние годы стали появляться работы по синтезу циклазинов путем трехкомпонентных реакций с участием сравнительно простых и доступных соединений (схема 5) [8].

**Схема 5.** Пример синтеза (3.3.2)циклазина с использованием трехкомпонентной реакции

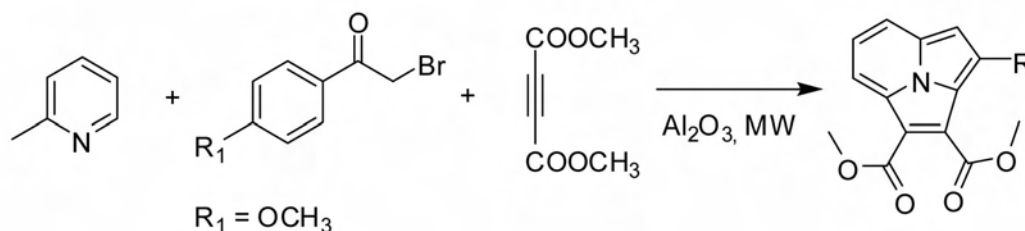


Вместе с тем примеры использования трехкомпонентных реакций в синтезе производных (3.2.2)циклазин-1,2-дикарбоновых кислот пока довольно редки. Так, имеются данные о возможности проведения реакции циклоприсоединения в водной среде с получением ряда 3-замещенных 1,2дикарбометокси(3.2.2)циклазинов [9]. Окислителем при этом, как предполагают авторы, выступает молекулярный кислород, а активация возможна как термически (температура 100°C), так и под действием микроволнового излучения (мощность 300 Вт). В качестве примера на схеме 6 приведен синтез 3-фенил-1,2-дикарбометокси(3.2.2)циклазина, выход которого при термической активации составил 70%, а при микроволновой — 90%.

Авторами работы [10] описана аналогичная трехкомпонентная реакция синтеза арилзамещенного диэфира на окиси алюминия в отсутствие растворителя, активируемая микроволновым излучением мощностью 300 Вт (схема 7).

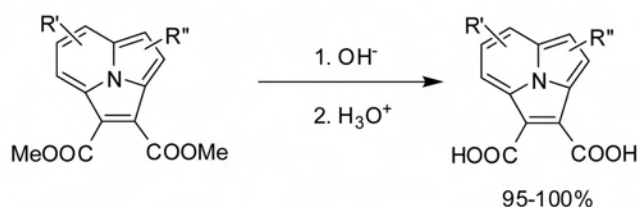
(3.2.2.)Циклазин-1,2-дикарбоновые кислоты обычно получают щелочным гидро-

Схема 7. Синтез замещенного 1,2-дикарбометокси(3.2.2)циклазина на окиси алюминия в отсутствие растворителя



лизом соответствующих диметилвых эфиров с последующим подкислением концентрированной соляной кислотой (схема 8) [4].

Схема 8. Синтез (3.2.2)циклазин-1,2-дикарбоновых кислот



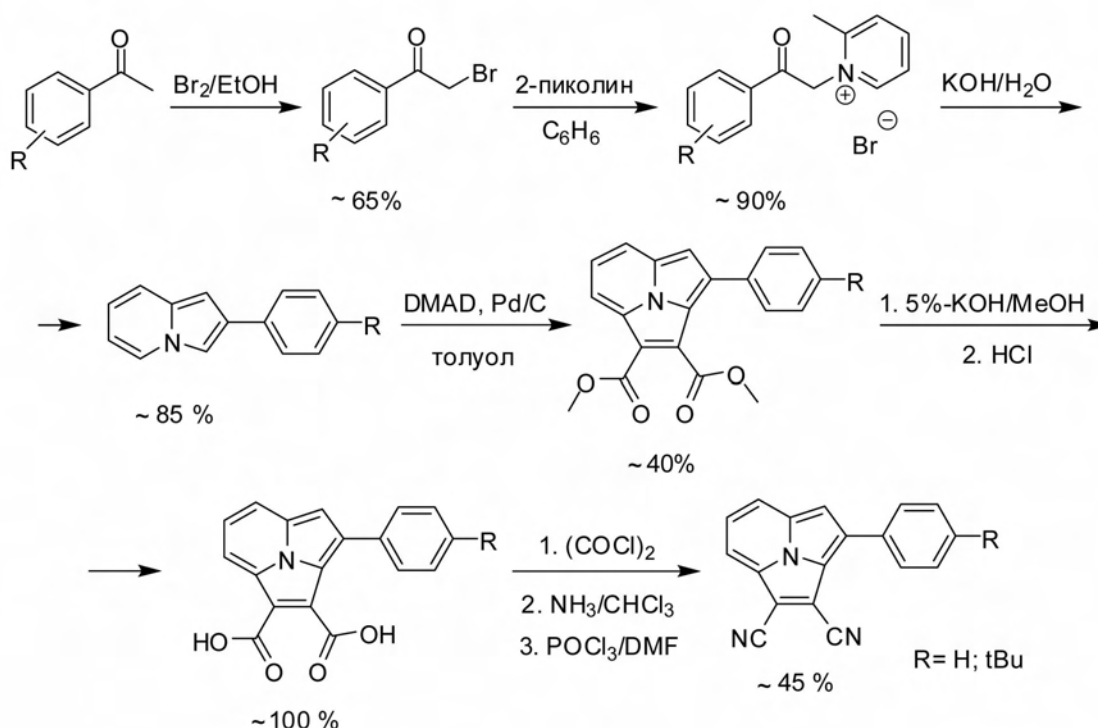
Проводя аналогию с широко исследованными в синтезе макроциклов производными фталевых кислот, справедливо полагать, что в ряду предшественников (3.2.2)циклазинаннелированных порфиразинов наиболее перспективными окажутся соответствующие 1,2-дикарбонитри-

лы, ни один из представителей которых к настоящему моменту в литературе не описан. Нами предложена схема синтеза 3-фенил- и 3-(*n*-трет-бутилфенил)(3.2.2)циклазин-1,2-дикарбонитрилов (схема 9). Получены не описанные ранее хлорангидриды, амиды и нитрилы. В настоящее время проводится оптимизация данной схемы.

Целевые соединения охарактеризованы методами спектроскопии ЯМР  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , а также ESI масс-спектрометрии.

Таким образом, нами предложен и осуществлен синтез ранее не описанных 3-арил(3.2.2)циклазин-1,2-дикарбонитрилов, и проведена их достоверная идентификация. В дальнейшем планируется проведение оптимизации описанного подхода, а также изучение возможных путей макроциклизации получаемых производных (3.2.2)циклазин-1,2-дикарбоновой кислоты.

Схема 9. Синтез 3-арил(3.2.2)циклазин-1,2-дикарбонитрилов



Работа выполнена в рамках Государственного задания 2018 года (тема № 45.5 «Создание соединений с заданными физико-химическими свойствами») при поддержке Совета по грантам Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых и по государственной поддержке ведущих научных школ Российской Федерации (грант МД-2991.2017.3).

### Литература

1. J.Fabian, H.Nakazumi, M.Matsuoka. *Chemical Reviews*, **92** (6), 1197–1226 (1992)
2. V.E.Pushkarev, V.N.Nemykin, L.G.Tomilova. *Coordination Chemistry Reviews*, **319**, 110–179 (2016)
3. M.Suzuki, T.Hoshino, S.Neya. *Organic Letters*, **16** (2), 327–329 (2014)
4. A.Galbraith, T.Small, R.A.Barnes, V.Boekelheide. *Journal of the American Chemical Society*, **83**, 453–458 (1961)
5. A.G.Kuznetsov, A.A.Bush, E.V.Babaev. *Tetrahedron*, **64**, 749–756 (2008)
6. H.Kojima, Y.Kinoshita, N.Matsumura, H.Inoue. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, **28**, 2059–2060 (1991)
7. A.I.Zinin, E.V.Babaev. *Russian Chemical Bulletin*, **46**, 609–610 (1997)
8. H.Sun, H.Zhou, O.Khorev, R.Jiang, T.Yu, X.Wang, Y.Du, Y.Ma, T.Meng, J.Shen. *Journal of Organic Chemistry*, **77**(23), 10745–10751 (2012)
9. S.Gogoi, M.Dutta, J.Gogoi, R.C.Boruah. *Tetrahedron Letters*, **52**, 813–816 (2011)
10. M.SheelaGopal, I.Anitha, S.Jesny. *Journal of Luminescence*, **179**, 361–365 (2016)



# 1,4-Диазепинопорфиразины — новый класс структурных блоков для создания супрамолекулярных систем

Е.Н.Тараканова,<sup>1</sup> П.А.Тараканов,<sup>1</sup> Л.Г.Томилова,<sup>1,2</sup> В.Е.Пушкарев<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Лаборатория фталоцианинов и их аналогов ИФАВ РАН

<sup>2</sup> МГУ им. М.В. Ломоносова, Химический факультет

На пути к созданию материалов с заданными характеристиками на основе тетрапиррольных макроциклов важное значение имеет возможность управления процессами самоорганизации молекул в конденсированной фазе. Поэтому поиск новых производных, способных к направленной самосборке в супрамолекулярные системы, является актуальной задачей. Особый интерес при этом представляют соединения, склонные к формированию упорядоченных супрамолекулярных структур посредством нековалентных межмолекулярных взаимодействий (водородные связи, координация металл–лиганд, дисперсионные и  $\pi$ – $\pi$ -взаимодействия).

Диазепинопорфиразины — аналоги фталоцианинов, в которых бензольные кольца заменены на непланарные 1,4-дiazepиновые фрагменты (рис. 1) — являются одними из представителей такого рода структур. Впервые diazepинопорфиразины были получены в 1999 г. группой ученых во главе с профессором Эрколани [1]. Данные соединения проявили нетипичные для фталоцианиновых производных спектральные особенности, которые долгое время не находили

должного объяснения. Наличие расщепленной Q-полосы в ЭСП металлокомплексов diazepинопорфиразинов преимущественно объяснялось влиянием неподеленных электронных пар атомов азота 1,4-diazepиновых гетероциклов. Однако дальнейшие исследования [2–4] показали, что необычные физико-химические свойства diazepинопорфиразинов обусловлены их способностью к образованию стабильных димеров *H*-типа. Склонность к специфическим межмолекулярным взаимодействиям с участием diazepиновых гетероциклов создает предпосылки для формирования на основе diazepинопорфиразинов упорядоченных супрамолекулярных ансамблей. Изучение природы этих взаимодействий имеет важное фундаментальное значение, так как позволяет находить новые пути структурного упорядочения молекул в конденсированной фазе.

Сэндвичевые комплексы редкоземельных элементов (РЗЭ) с тетрапиррольными макроциклами благодаря уникальным физико-химическим свойствам являются перспективной основой материалов для нелинейной оптики, молекулярной электроники и спинтроники [5–10]. Склонность diazepинопорфиразинов к специфическим межмолекулярным взаимодействиям делает данные соединения перспективными лигандами для синтеза на их основе комплексов РЗЭ. Кроме того, возможность введения функциональных заместителей в 5, 6 и 7 положения 1,4-diazepинового гетероцикла на стадии синтеза 1,4-diazepин-2,3-дикарбонитрила расширяет круг возможностей модификации сэндвичевых структур, что позволяет управлять их свойствами на молекулярном уровне.

Нами была получена серия гомолептических сэндвичевых комплексов РЗЭ на основе замещен-

**Е.Н.Тараканова.** Кандидат химических наук, научный сотрудник лаборатории фталоцианинов и их аналогов ИФАВ РАН. e-mail: tarakanova.ek.nik@gmail.com

**П.А.Тараканов.** Кандидат химических наук, научный сотрудник лаборатории фталоцианинов и их аналогов. e-mail: tarakanov\_ra@ipac.ac.ru

**Л.Г.Томилова.** Доктор химических наук, главный научный сотрудник лаборатории фталоцианинов и их аналогов ИФАВ РАН, профессор Химического факультета МГУ им. М.В.Ломоносова.

e-mail: tom@org.chem.msu.ru

**В.Е.Пушкарев.** Доктор химических наук, главный научный сотрудник, заведующий лабораторией фталоцианинов и их аналогов ИФАВ РАН.

e-mail: pushkarev@ipac.ac.ru

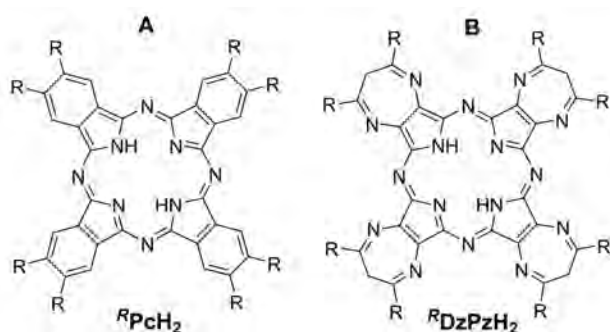
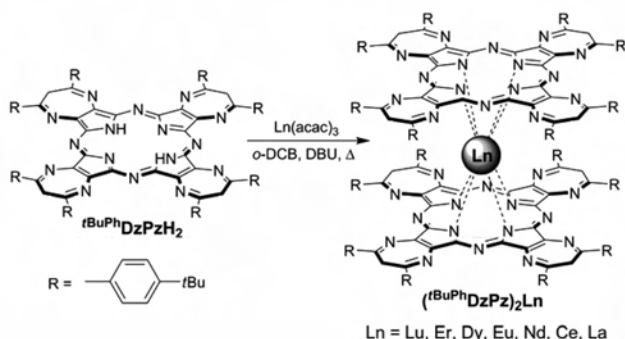


Рис. 1. Строение фталоцианина (А) и тетрадиазепинопорфирина (В).

ного тетрадиазепинопорфирина ( ${}^t\text{Bu}^{\text{Ph}}\text{DzPz}$ ) $_2\text{Ln}$  (схема 1) и исследованы закономерности «структура – свойство» для данного типа соединений [11–14]. Стоит отметить, что до начала наших исследований комплексы данного типа не были описаны в литературе, более того, существовала лишь одна работа по синтезу порфиразинов РЗЭ с аннелированными гетероциклами [15].

Схема 1. Синтез двухпалубных комплексов ( ${}^t\text{Bu}^{\text{Ph}}\text{DzPz}$ ) $_2\text{Ln}$ .



Специфика строения тетрадиазепинопорфиринового лиганда  ${}^t\text{Bu}^{\text{Ph}}\text{DzPzH}_2$  позволила осуществлять синтез сэндвичевых комплексов в относительно мягких условиях (см. схему 1), разработанных ранее для селективного получения монофталоцианинатов РЗЭ [16], а также синтезировать стабильные к диссоциации двухпалубные комплексы РЗЭ начала ряда ( $\text{Ln} = \text{Nd}, \text{La}$ ) с высокими выходами [13].

С целью изучения структурных особенностей бис(диазепинопорфиразинов) РЗЭ и выяснения природы характерных межлигандных взаимодействий, обусловленных влиянием диазепиновых фрагментов, нами был применен комплексный подход с использованием комбинации

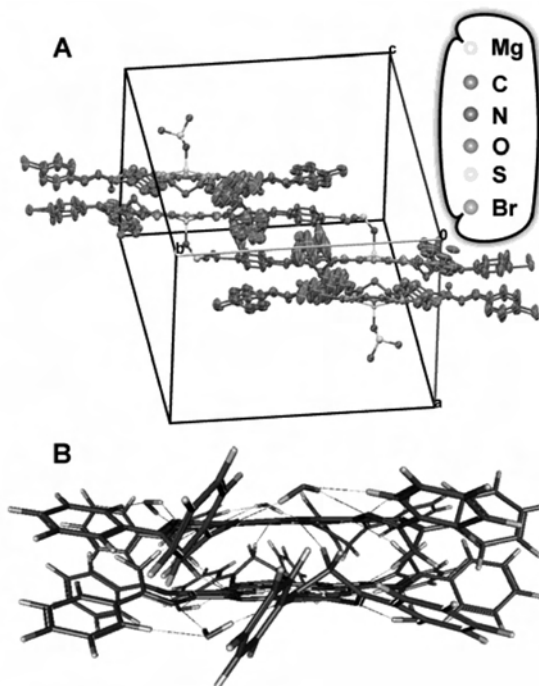


Рис. 2. Элементарная ячейка монокристалла комплекса  $p\text{-BrStyrDzPzMg}$  (атомы водорода не показаны) (А); DFT-оптимизированная структура димера лиганда  ${}^{\text{Ph}}\text{DzPzH}_2$  (В).

экспериментальных и теоретических методов. Полученные данные рентгеноструктурного анализа  $p$ -бромфенилэтилзамещенного тетрадиазепинопорфиразината магния  $p\text{-BrStyrDzPzMg}$  (рис. 2А) [17], а также квантово-химических расчетов, выполненных для лиганда  ${}^{\text{Ph}}\text{DzPzH}_2$  (рис. 2В) и сэндвичевых комплексов ( ${}^{\text{Ph}}\text{DzPz}$ ) $_2\text{Ln}$ , в совокупности с данными ЭСП и двумерной спектроскопии ЯМР [11] позволили однозначно установить природу межмолекулярных взаимодействий в 1,4-диазепинопорфиразинах.

Так, обнаружено два типа характерных водородных связей: межлигандное взаимодействие аксиальных протонов  $\text{CH}_2$ -групп диазепиновых колец одного макроцикла и мезо-атомов азота соседнего макроцикла ( $\text{C}-\text{H}^{\text{ax}}\dots\text{N}^{\text{meso}}$ ) и взаимодействие лиганд – вода (рис. 2В) между протонами молекулы воды и атомами азота соседних диазепиновых фрагментов ( $\text{O}-\text{H}\dots\text{N}^{\text{Dz}}$ ). Именно формирование межлигандных водородных связей способствует образованию двухпалубных комплексов на основе диазепинопорфиразинов в относительно мягких условиях по сравнению с фталоцианиновыми аналогами, а также обуславливает высокую стабильность сэндвичевых комплексов РЗЭ начала ряда.

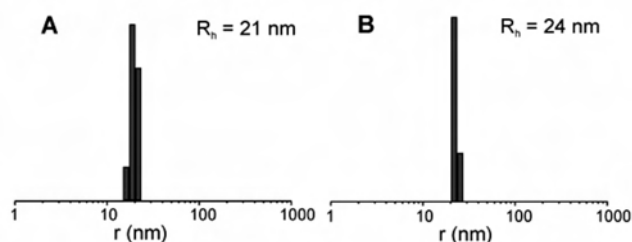


Рис. 3. Результаты ДРС для  $(t\text{BuPhDzPz})_2\text{Lu}$  (А) и  $(t\text{BuPhDzPz})_2\text{La}$  (В) в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  при 296 К,  $C = 1 \cdot 10^{-4}$  М.

Наличие водородных связей также обуславливает склонность гомолептических комплексов  $(t\text{BuPhDzPz})_2\text{Ln}$  к специфической агрегации в нейтральной форме [11]. Так, исследование растворов свежеприготовленных нейтральных форм комплексов с помощью метода динамического рассеяния света (ДРС) выявило образование наночастиц со средним гидродинамическим радиусом  $R_h \sim 20$  нм (рис. 3).

Восстановленные формы комплексов согласно данным ЭСП и ДРС не проявляют склонности к агрегации в растворе. Вместе с тем исследование микроструктуры пленок методом сканирующей электронной микроскопии (ПЭ-СЭМ) показало, что комплексы  $(t\text{BuPhDzPz})_2\text{Ln}$  в восстановленной форме способны к формированию более сложных ассоциатов сферической формы, размер которых зависит от типа РЗЭ и увеличивается от 100 до 400 нм при переходе от Lu к La соответственно (рис. 4) [11].

Склонность  $(t\text{BuPhDzPz})_2\text{Ln}$  к специфической агрегации позволяет предложить данные соединения в качестве перспективных блоков для создания супрамолекулярных систем.

Спектральные исследования на примере тетрадиазепинопорфиразинов магния с различными заместителями  $^R\text{DzPzMg}$  продемонстрировали, что эффективное управление процессом

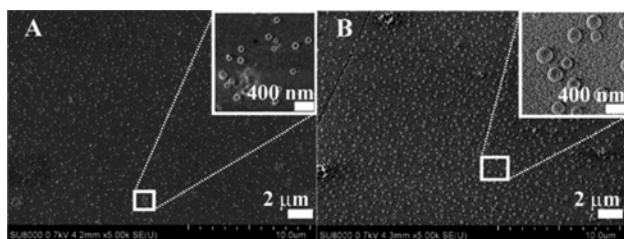


Рис. 4. ПЭ-СЭМ изображения пленок, образуемых комплексами  $(t\text{BuPhDzPz})_2\text{Lu}$  (А), и  $(t\text{BuPhDzPz})_2\text{La}$  (В).

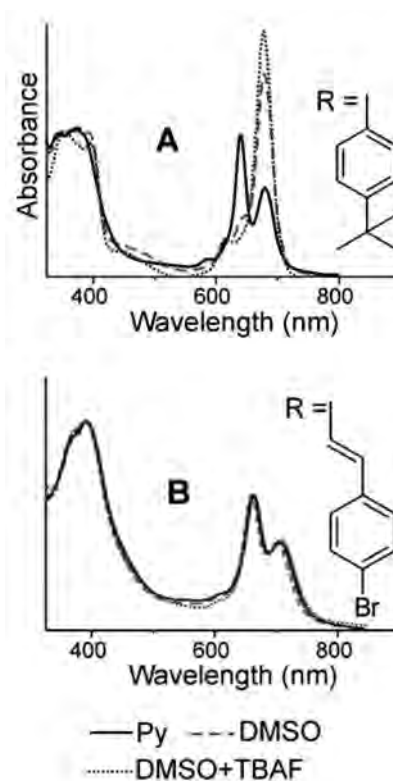


Рис. 5. Спектральные изменения для комплексов  $^R\text{DzPzMg}$ , демонстрирующие влияние заместителей ( $R$ ) в диазепиновом гетероцикле, растворителя и добавки  $\text{F}^-$  на равновесие «димер–мономер». Py — пиридин.  $C_M(^R\text{DzPzMg}) = 5 \mu\text{M}$ .  $C_M(\text{F}^-) = 500 \mu\text{M}$ .

самоорганизации тетрадиазепинопорфиразинов и структурой образующихся димеров возможно путем варьирования заместителей в составе диазепинового гетероцикла, специфическим выбором растворителя, а также путем обратимой аксиальной координации анионов (рис. 5) [17].

При этом сила межмолекулярных взаимодействий (водородных связей) в диазепинопорфиразинах, в первую очередь, определяется степенью комплементарности периферийных заместителей в 1,4-диазепиновых фрагментах. Так, полученный *n*-бромфенилэтенилзамещенный димер *p*-BrStyrDzPzMg благодаря высокой степени комплементарности периферийных заместителей, в отличие от *tert*-бутилфенилзамещенного аналога, оказался стабилен к диссоциации даже под действием такого сильного координирующего агента как  $\text{F}^-$  (см. рис. 5).

Результаты исследования токсичности полученных комплексов позволяют отнести их к классу низкотоксичных соединений, что важно с точки зрения создания биосовместимых материалов.

Таким образом, результаты проведенных нами исследований свидетельствуют о том, что 1,4-дiazепинопорфиразины и их металлокомплексы являются перспективными объектами для создания уникальных функциональных материалов на основе принципов супрамолекулярной химии.

Работа выполнена в рамках Государственного задания 2018 года (тема № 45.5 «Создание соединений с заданными физико-химическими свойствами») при поддержке Совета по грантам Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых и по государственной поддержке ведущих научных школ Российской Федерации (грант МД-2991.2017.3).

## Литература

1. M.P. Donzello, C. Ercolani, P.A. Stuzhin, A. Chiesi-Villa, C. Rizzoli. *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2075–2084 (1999)
2. P.A. Tarakanov, M.P. Donzello, O.I. Koifman, P.A. Stuzhin. *Macroheterocycles*, **4** (3), 177–183 (2011)
3. P.A. Stuzhin, P. Tarakanov, S. Shiryaeva, A. Zimenkova, O.I. Koifman, E. Viola, M.P. Donzello, C. Ercolani. *J. Porphyrins Phthalocyanines*, **16**, 968–976 (2012)
4. P.A. Tarakanov, A.O. Simakov, A.Y. Tolbin, I.O. Balashova, V.I. Shestov, L.G. Tomilova. *Spectrochim. Acta, Part A*, **139**, 464–470 (2015)
5. M.L. Rodriguez-Mendez, J. Antonio de Saja. *J. Porphyrins Phthalocyanines*, **13**, 606–615 (2009)
6. H.Q. Wang, M. Batentschuk, A. Osvet, L. Pinna, J. Brabec Christoph, *Adv. Mater.*, **23**, 2675–2680 (2011)
7. J. Kan, Y. Chen, D. Qi, Y. Liu, J. Jiang. *Adv. Mater.*, **24**, 1755–1758 (2012)
8. C. Pal, A.K. Sharma, A.N. Cammidge, M.J. Cook, A.K. Ray, *J. Phys. Chem. B*, **117**, 15033–15040 (2013)
9. N. Ishikawa, M. Sugita, W. Wernsdorfer. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **44**, 2931–2935 (2005)
10. P. Zhang, L. Zhang, J. Tang. *Dalton Trans.*, **44**, 3923–3929 (2015)
11. E.N. Tarakanova, S.A. Trashin, A.O. Simakov, T. Furuyama, A.V. Dzuban, L.N. Inasaridze, P.A. Tarakanov, P.A. Troshin, V.E. Pushkarev, N. Kobayashi, L.G. Tomilova. *Dalton Trans.*, **45**, 12041–12052 (2016)
12. E.N. Tarakanova, O.A. Levitskiy, T.V. Magdesieva, P.A. Tarakanov, V.E. Pushkarev, L.G. Tomilova. *New J. Chem.*, **39**, 5797–5804 (2015)
13. E.N. Tarakanova, S.A. Trashin, P.A. Tarakanov, V.E. Pushkarev, L.G. Tomilova. *Dyes Pigm.*, **117**, 61–63 (2015)
14. E.N. Tarakanova, P.A. Tarakanov, V.E. Pushkarev, L.G. Tomilova. *J. Porphyrins Phthalocyanines*, **18**, 149–154 (2013)
15. T.V. Dubinina, D.V. Dyumaeva, S.A. Trashin, M.V. Sedova, A.S. Dudnik, N.E. Borisova, L.G. Tomilova, N.S. Zefirov. *Dyes Pigm.*, **96**, 699–704 (2013)
16. V.E. Pushkarev, M.O. Breusova, E.V. Shulishov, Y.V. Tomilov. *Russ. Chem. Bull. Int. Ed.*, **54**, 2087–2093 (2005)
17. P.A. Tarakanov, E.N. Tarakanova, P.V. Dorovatovskii, Y.V. Zubavichus, V.N. Khrustalev, S.A. Trashin, K. De Wael, M.E. Neganova, D.V. Mischenko, J.L. Sessler, P.A. Stuzhin, V.E. Pushkarev, L.G. Tomilova. *Dalton Trans.*, 2018. DOI: 10.1039/C8DT00384J

# Изучение цитотоксической активности производных 5-амино-3-(2-аминопропил)-1,2,4-тиадиазола

Е.Л.Лузина,<sup>1</sup> А.Н.Прошин,<sup>1</sup> И.В.Серков,<sup>1</sup> М.Г.Акимов,<sup>2</sup>  
Е.В.Фомина-Агеева,<sup>2</sup> В.В.Безуглов,<sup>2</sup> Т.П.Трофимова,<sup>3</sup> М.А.Орлова,<sup>3</sup>  
С.О.Бачурин<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Институт физиологически активных веществ Российской академии наук*

<sup>2</sup> *Институт биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова Российской академии наук*

<sup>3</sup> *Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, Химический факультет*

В настоящее время в структуре заболеваемости и смертности человека злокачественные новообразования занимают второе место. Для лечения онкологических заболеваний используются как традиционные, так и апробируются новые подходы, такие как фотодинамическая терапия, иммунотерапия, онколитические вирусы, генная терапия и вакцинация раковыми антигенами. Как следствие, разработка и осуществление стратегии направленного синтеза новых проти-

воопухолевых препаратов является одной из приоритетных задач современной медицинской химии.

Также одним из перспективных направлений поиска новых эффективных фармацевтических субстанций является молекулярный дизайн многофункциональных препаратов, способных взаимодействовать одновременно с несколькими мишенями. Значимую роль в конструировании новых препаратов играют различные методы компьютерного моделирования, в том числе прогнозирование спектров биологической активности новых соединений, в частности, программой PASS — Prediction of Activity Spectra for Substances (Прогноз спектра активности веществ) [1–4].

Программа PASS — современный отечественный инновационный инструмент для оценки общего биологического потенциала оригинальной лекарственно-подобной молекулы — предлагает одновременное прогнозирование многих видов биологической активности и выполняется алгоритмом на основе «наивного Байесовского подхода» и взаимосвязи «структура – активность». Программный продукт PASS представлен как локальными версиями программы PASS, так и веб-ресурсом на основе PASS, свободно доступном в сети Интернет. Программа PASS позволяет не только прогнозировать возможную биологическую активность, но и определять взаимосвязь «фермент – мишень» или «субстрат – мишень», воздействие на которые и фор-

**Е.Л.Лузина.** Научный сотрудник лаборатории фосфорорганических соединений ИФАВ РАН.

e-mail: luzina@ipac.ac.ru

**А.Н.Прошин.** Кандидат химических наук, главный научный сотрудник, заведующий лабораторией специального органического синтеза ИФАВ РАН.

e-mail: proshin@ipac.ac.ru

**И.В.Серков.** Доктор химических наук, ведущий научный сотрудник той же лаборатории. e-mail: serkoviv@mail.ru

**М.Г.Акимов.** Кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории оксилипинов ИБХ РАН.

e-mail: akimovmike@yandex.ru

**Е.В.Фомина-Агеева.** Кандидат химических наук, научный сотрудник той же лаборатории. e-mail: evfa57@gmail.com

**В.В.Безуглов.** Доктор химических наук, главный научный сотрудник той же лаборатории. e-mail: vvbez@mx.ibch.ru

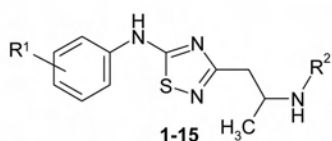
**Т.П.Трофимова.** Кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории радиофармацевтической химии Химического факультета МГУ им. М.В.Ломоносова. e-mail: tptrof@mail.ru

**М.А.Орлова.** Доктор химических наук, ведущий научный сотрудник той же лаборатории.

e-mail: orlova.radiochem@mail.ru

**С.О.Бачурин.** Доктор химических наук, член-корреспондент РАН, директор ИФАВ РАН.

e-mail: bachurin@ipac.ac.ru



№	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	№	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>
1	3-Cl		9	3-Cl-4-Me	
2	3-Cl		10	3-Cl-4-Me	
3	3,4-Cl <sub>2</sub>	Me	11	3-Cl-4-F	
4	3,4-Cl <sub>2</sub>		12	3-Cl-4-F	
5	3,4- Cl <sub>2</sub>		13	4-Me	
6	3,4- Cl <sub>2</sub>		14	4-Br	
7	3,4- Cl <sub>2</sub>		15	4-MeCH(OH)	
8	3,4- Cl <sub>2</sub>				

Рис. 1. Общая структура и таблица радикалов производных 5-амино-3-(2-аминопропил)-1,2,4-тиадиазола.

мирует биологическую активность исследуемого соединения.

С помощью программы PASS и ее сервисов [1, 5, 6] был сделан прогноз на возможную цитотоксичность для соединений на основе 5-амино-1,2,4-тиадиазола.

Производные 1,2,4-тиадиазола, синтез которых за последние 10 лет представлен в обзоре [7], обладают разнообразной биологической активностью за счет сильной ароматичности циклической системы, что приводит к высокой стабильности *in vivo*. Из литературных источников известно, что производные 1,2,4-тиадиазола [8] применяются в качестве основы для препаратов различного терапевтического действия: антигипертензивного [9], противосудорожного [10], противовоспалительного [11], нейропротекторного [12] и для лечения и профилактики нейродегенеративных заболеваний, например, болезни Альцгеймера [13]; замещенные 3,5-бис(индолил)-1,2,4-тиадиазолы показали противорако-

Таблица 1. Результаты расчетного прогноза на цитотоксичность для соединений 1–15 с помощью on-line сервиса Cell Line Cytotoxicity Predictor.

Соединение	Максимальное значение коэффициентов	Клетки остеосаркомы человека	Лейкемические клетки разного типа
	Pa/Pi	Pa/Pi	Pa/Pi
1	0.323/0.031	0.322/0.088, 0.252/0.161 HOS	0.315/0.116
2	0.247/0.005	0.322/0.088	0.247/0.005
3	0.290/0.044	0.138/0.079	0.269/0.204
4	0.316/0.040	0.288/0.149, 0.255/0.154 HOS	0.103/0.063
5	0.396/0.110	0.330/0.077	0.103/0.024
6	0.342/0.063	0.342/0.063	0.225/0.163 MOLT-4
7	0.266/0.004	0.292/0.141, 0.129/0.126 HOS	0.266/0.004
8	0.429/0.049	0.286/0.154	0.205/0.051, 0.239/0.144 MOLT-4
9	0.343/0.014	0.141/0.075	0.289/0.161
10	0.318/0.037	0.259/0.215	0.229/0.005
11	0.379/0.030	0.379/0.030, 0.296/0.078 HOS	0.335/0.152
12	0.374/0.034	0.374/0.034, 0.238/0.192 HOS	0.263/0.004
13	0.322/0.026	0.141/0.075	0.278/0.004
14	0.232/0.005	0.132/0.111	0.232/0.005
15	0.620/0.011	0.248/0.240	0.344/0.161

Примечание. Pa — расчетное значение вероятности наличия активности, Pi — расчетное значение вероятности отсутствия активности.

вую активность на линиях трансформированных клеток [14].

Целью настоящей работы является прогнозирование с помощью программного продукта PASS и исследование цитотоксической активности в отношении опухолевых клеточных линий *in vitro* оригинальных производных 5-арил-амино-3-(2-аминопропил)-1,2,4-тиадиазола общей структуры, представленной на рис. 1, синтез которых описан в наших работах [15–18].

Соединения 1, 6, 8, 10 — гидрохлориды, соединения 2 и 9 представлены как основаниями, так и гидрохлоридами.

Для оценки спектра биологической активности соединений 1–15 был проведен виртуальный скрининг с помощью программы PASS online и скрининг по постоянно обновляемой лицензионной версии (версия PASS 2017, которая

в настоящий момент предсказывает 5050 видов биологической активности). Результат прогноза предоставлен в виде списка названий активностей с расчетными значениями вероятностей наличия (Pa) или отсутствия (Pi) каждого из видов активности.

Для проверки соединений **1–15** на возможную цитотоксическую активность был сделан прогноз с помощью сервиса CLC-Predictor. Результаты представлены в табл. 1.

Вероятность того, что исследуемые соединения проявят цитотоксическую активность, составляет около 30–40%, для соединения **15** — 60%. Чтобы сделать окончательное заключение, необходимо проведение экспериментальных исследований.

Исследование цитотоксической активности представленных соединений проведено на различных раковых клетках: глиома С6 крысы (17 соединений), остеосаркома человека НОS (5 соединений) и лейкоэмические клетки разного типа (3 соединения). Методики проведения биологических тестов на цитотоксичность описаны в [18, 19]. Полученные результаты представлены в табл. 2–4.

Как видно из табл. 2, большинство соединений проявило активность в пределах 2–20 мкМ, за исключением соединений **5** и **13**. Наиболее высокие значения наблюдались у соединений **8\***, **4** и **7**.

На данной линии клеток активность соединений находилась в пределах 20–50 мкМ.

Наиболее высокие значения наблюдались у соединений **7** и **10**. Расчетный прогноз на вероятность цитотоксической активности на клетках остеосаркомы человека (см. табл. 1) для соединений **4**, **6**, **7**, **10** и **11** подтвержден эксперимен-

**Таблица 2.** Результаты цитотоксической активности соединений **1–15** на клетках глиомы С6 крысы.

Соединение	LC <sub>50</sub> , мкМ	Соединение	LC <sub>50</sub> , мкМ
<b>1*</b>	21 ± 4	<b>9</b>	15.9 ± 0.3
<b>2</b>	14 ± 4	<b>9*</b>	18 ± 8
<b>2*</b>	21 ± 8	<b>10*</b>	10 ± 4
<b>3</b>	15.4 ± 0.3	<b>11</b>	9 ± 11
<b>4</b>	6 ± 5	<b>12</b>	11 ± 1
<b>5</b>	94 ± 9	<b>13</b>	79 ± 9
<b>6*</b>	10 ± 4	<b>14</b>	20 ± 2
<b>7</b>	6 ± 5	<b>15</b>	14 ± 2
<b>8*</b>	2.9 ± 0.6		

\* Данные приведены для гидрохлоридов соединений.

**Таблица 3.** Результаты цитотоксической активности некоторых соединений на клетках остеосаркомы человека НОS.

Соединение	LC <sub>50</sub> , мкМ
<b>4</b>	26.5 ± 0.7
<b>6*</b>	28 ± 6
<b>7</b>	20 ± 6
<b>10*</b>	20 ± 7
<b>11</b>	51 ± 3

\* Данные приведены для гидрохлоридов соединений.

тально, несмотря на невысокие расчетные коэффициенты Pa/Pi.

Из табл. 4 видно, что изученные нами производные 5-амино-3-(2-аминопропил)-1,2,4-тиадиазола **6**, **9\***, **10** на порядок более цитотоксичны по сравнению с салицилатом цинка (наблюдается уменьшение выживаемости клеток на порядок и более). Наибольшее увеличение цитотоксичности соединений наблюдалось по отношению к клеткам костного мозга пациентов с ОМЛ и к клеткам промиелоцитарного лейкоза (HL-60). Соединение **10** было на порядок цито-

**Таблица 4.** Результаты цитотоксической активности соединений **6**, **9\***, **10** и ZnSal<sub>2</sub> в отношении лейкоэмических клеток разного типа и клеток здоровых доноров под действием соединений **6**, **9\***, **10** и ZnSal<sub>2</sub>.

Соединение	LC <sub>50</sub> /мкмоль · мл <sup>-1</sup>				
	ЗД (см. <sup>а</sup> )	K-562	MOLT-4	HL-60	ОМЛ (см. <sup>б</sup> )
<b>6*</b>	0.028 ± 0.002	0.034 ± 0.005	0.023 ± 0.003	0.015 ± 0.003	0.033 ± 0.003
<b>9*</b>	0.010 ± 0.002	0.013 ± 0.002	0.011 ± 0.002	0.011 ± 0.001	0.015 ± 0.003
<b>10*</b>	0.012 ± 0.002	0.0035 ± 0.0005	0.0045 ± 0.0005	0.0010 ± 0.0002	0.0030 ± 0.0005
ZnSal <sub>2</sub> (см. <sup>с</sup> )	1.13 ± 0.08	0.71 ± 0.08	0.65 ± 0.05	0.94 ± 0.08	0.80 ± 0.06

<sup>а</sup> Лимфоциты здоровых доноров; <sup>б</sup> Клетки костного мозга нелеченых пациентов с диагнозом острый миелобластный лейкоз; <sup>с</sup> вещество сравнения; \* Данные приведены для гидрохлоридов соединений.

**Таблица 5.** Расчетные молекулярные механизмы действия, влияющие на антираковую активность соединений **1–15**, определенные с помощью программы PASS.

Соединение	Расчетные молекулярные механизмы действия (PASS program)					
	Cyclophilin D inhibitor	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase inhibitor	Caspase 9 stimulant	Cyclin H inhibitor	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Fgr inhibitor	Protein-tyrosine kinase p55(blk) inhibitor
			Pa/Pi			
<b>1</b>	0.563/0.018	0.552/0.019	—	0.248/0.062	0.210/0.121	—
<b>2</b>	0.565/0.018	0.551/0.019	—	0.235/0.081	0.538/0.004	0.342/0.010
<b>3</b>	0.520/0.023	0.503/0.026	0.508/0.077	0.276/0.037	—	—
<b>4</b>	0.567/0.017	0.557/0.019	—	0.266/0.043	0.207/0.125	—
<b>5</b>	0.438/0.038	0.427/0.041	0.292/0.255	—	—	—
<b>6</b>	0.483/0.029	0.471/0.032	0.392/0.162	0.239/0.074	—	—
<b>7</b>	0.569/0.017	0.554/0.019	—	0.251/0.058	0.540/0.004	0.343/0.009
<b>8</b>	0.515/0.024	0.506/0.025	0.278/0.276	0.253/0.056	—	—
<b>9</b>	0.528/0.022	0.522/0.023	—	0.240/0.073	0.211/0.120	—
<b>10</b>	0.543/0.020	0.533/0.022	—	0.224/0.099	0.528/0.004	0.330/0.011
<b>11</b>	0.553/0.019	0.542/0.021	—	0.208/0.138	0.186/0.160	—
<b>12</b>	0.556/0.019	0.541/0.021	—	0.198/0.168	0.520/0.004	0.349/0.009
<b>13</b>	0.583/0.016	0.566/0.018	—	0.204/0.149	0.542/0.003	0.339/0.010
<b>14</b>	0.577/0.016	0.561/0.018	—	—	0.516/0.004	0.344/0.009
<b>15</b>	0.532/0.022	0.521/0.023	0.372/0.178	—	—	—

**Примечание.** Pa — расчетное значение вероятности наличия активности; Pi - расчетное значение вероятности отсутствия активности

токсичнее по отношению ко всем использованным лейкоэмическим клеткам, чем остальные гидрохлориды. В целом гидрохлориды производных 5-амино-3-(2-аминопропил)-1,2,4-тиадиазола (**6**, **9\***, **10**) проявляют цитотоксичность в интервале значений  $LC_{50}$  того же порядка, что и по отношению к клеткам глиомы (C6) и остеосаркомы (HOS), что свидетельствует, по-видимому, о неспецифичности их действия и общности биологических мишеней.

Расчетное прогнозирование цитотоксической активности (см. табл. 1) для соединений **6**, **9\*** и **10** на лейкоэмических клетках разного типа также подтверждено экспериментально.

Среди полученного спектра биологических активностей для соединений **1–15**, рассчитанных по лицензионной версии программы PASS (версия PASS 2017) было найдено несколько наиболее повторяющихся расчетных молекулярных механизмов действия, которые могут являться влияющими на антираковую активность исследуемых соединений **1–15**. Результаты представлены в табл. 5.

Из табл. 5 видно, что значения коэффициента Pa для различных молекулярных механизмов действия или возможных мишеней для

исследуемых соединений **1–15** находятся преимущественно в интервале 0.3–0.58. Относительно низкие значения коэффициентов Pa указывают на отсутствие существенного сходства с известными противоопухолевыми препаратами. В случае экспериментального подтверждения цитотоксической активности такие вещества могут оказаться принципиально новыми структурами, принадлежащими к химическому классу или структурам, где данная активность ранее не была выявлена.


Во всех экспериментах указанные соединения проявляли умеренную или сильную цитостатическую активность и вызывали гибель раковых клеток в концентрациях от 2 до 100 мкМ.

Таким образом, расчетное прогнозирование цитотоксического действия соединений **1–15** экспериментально подтверждено на культурах различных раковых клеток, поэтому производные 5-амино-3-(2-аминопропил)-1,2,4-тиадиазола представляют интерес в качестве новых потенциальных противоопухолевых агентов с различными молекулярными механизмами действия и являются перспективными соединениями для дальнейшего изучения их антираковой активности.



**Литература**

1. <http://www.way2drug.com/PASSOnline/>
2. В.В.Поройков, Д.А.Филимонов. *Журн. Рос. хим. о-ва им. Д.И. Менделеева*, (2), 66–75 (2006)
3. Д.А.Филимонов, А.А.Лагунин, Т.А.Глориозова, А.В.Рудик, Д.С.Дружиловский, П.В.Погодин, В.В.Поройков. *Химия гетероциклических соединений*, (3), 483–499 (2014)
4. Д.А.Филимонов, Д.С.Дружиловский, А.А.Лагунин, Т.А.Глориозова, А.В.Рудик, А.В.Дмитриев, П.В.Погодин, В.В.Поройков. *Biomed. Chem.: Research and Methods*, **1** (1), e00004 (2018)
5. <http://www.way2drug.com/cell-line/>
6. А.А.Лагунин, V.I.Dubovskaja, A.V.Rudik, P.V.Pogodin, D.S.Druzhilovskiy, T.A.Gloriozova, D.A.Filimonov, N.G.Sastry, V.V.Poroikov. *Plos One*, **13** (1), e0191838 (2018)
7. L.M.T.Frija, A.J.L.Pombeiro, M.N.Kopylovich. *Eur. J. Org. Chem.*, (19), 2670–2682 (2017)
8. V.Krchnak, M.W.Holliay. *Chem. Rev.*, **102** (1), 61–92 (2002)
9. M.Tyagi, A.Kumar. *Oriental J. Chem.*, **18**, 125–130 (2002)
10. T.Akbarzadeh, S.A.Tabatabai, M.J.Khoshnoud, B.Shafaghi, A.Shafiee. *Bioorg. Med. Chem.*, **11** (5), 769–772 (2003)
11. A.A.El-Emam, O.A.Al-Deeb, M. A.Al-Omar, J.Lehmann. *Bioorg. Med. Chem.* **12** (19), 5107–5113 (2004)
12. A.Gupta, P.Mishra, S.N.Pandeya, S.K.Kashaw, V.Kashaw, J.P.Stables. *Eur. J. Med. Chem.*, **44** (3), 1100–1105 (2009)
13. A.Castro, T.Castano, A.Encinas, W.Porcal, C.Gill. *Bioorg. Med. Chem.*, **14** (5), 1644–1652 (2006)
14. M.Pal, V.R.Batchu, K.Parasuraman, K.R.Yeleswarapu. *J. Org. Chem.*, **68** (17), 6806–6809 (2003)
15. А.Н.Прошин, С.О.Бачурин. Патент РФ № 2449997 (2012)
16. А.Н.Прошин, И.В.Серков, С.О.Бачурин. *Доклады АН*, **446** (1), 48 (2012)
17. A.N.Proshin, I.V.Serkov, S.O.Vachurin. Патент WO2012050484 (2012)
18. А.Н.Прошин, И.В.Серков, М.Г.Акимов, Е.В.Фомина-Агеева, В.В.Безуглов, С.О.Бачурин. Патент РФ № 2536824 (2013)
19. М.А.Орлова, А.Н.Прошин, Т.П.Трофимова, А.П.Орлов. *Изв. АН. Сер. хим.*, (5), 932–934 (2017)



Работы в области  
физико-химических  
исследований  
и компьютерного  
моделирования  
новых соединений



# Развитие компьютерного молекулярного дизайна

О.А.Раевский

Отдел компьютерного молекулярного дизайна ИФАВ РАН

«В настоящее время КССА рассматривается во всем мире как главный метод химических исследований и часто используется в научных работах в областях агрохимии, биологии, окружающей среды, медицины и физической органической химии» [<http://chemwiki.ucdavis.edu/>].

Создание академического института подразумевает принципиально новые подходы к решению накопившихся проблем общества. К концу семидесятых годов серьезной проблемой мирового сообщества был биологический скрининг. Становилось очевидным, что биологические испытания новых химических соединений являются не только затратным но и невыполнимым занятием. В настоящее время установлено, что органическая химия может предоставить  $10^{180}$  химических соединений. И если бы все человечество занялось только скринингом новых соединений, эта работа затронула бы ничтожную часть химического пространства. В качестве альтернативы тотальному скринингу зарождается новое научное направление — компьютерный молекулярный дизайн, включая количественную связь «структура–активность» (КССА). На Западе основание этого направления связывают с именем Корвина Ганча, опубликовавшего в 1964 г. в журнале Американского химического общества статью о корреляции наркотического действия производных бензойной кислоты с липофильностью и константами заместителей Гаммета. Здесь, как обычно, забывается и о гениальном открытии Д.И. Менделеевым Периодического закона и о работах А.В.Лазарева, в 1944 г. опубликовавшего книгу

«Неэлектролиты», где были заложены основы токсикологии и КССА.

Развитие этого нового научного направления в ИФАВ РАН и было предложено мною директору И.В.Мартынову. В отличие от большинства коллег, Иван Васильевич не только поддержал это направление, но и стал соавтором 13 совместных статей. Краткое изложение основных достижений ОКМД за прошедший период представлено ниже.

## 1. Создание унифицированной шкалы водородных связей

Можно утверждать, что водородные связи являются инструментом природы, который поддерживает все жизненные процессы и управляет ими. Отсюда очевидна необходимость точного количественного учета эффектов водородного связывания в компьютерном молекулярном дизайне. Было предпринято множество попыток количественно охарактеризовать водородную связь в КССА. В начале 80-х годов нами была создана унифицированная шкала водородных связей на базе обширных термодинамических данных водородносвязанных комплексов (рис. 1, 2).

В последующие годы нами были предложены оригинальные 3D водородносвязанные дескрипторы из спектров межатомных взаимодействий, оригинальные потенциалы водород-



Рис. 1. Унифицированная шкала водородного связывания.

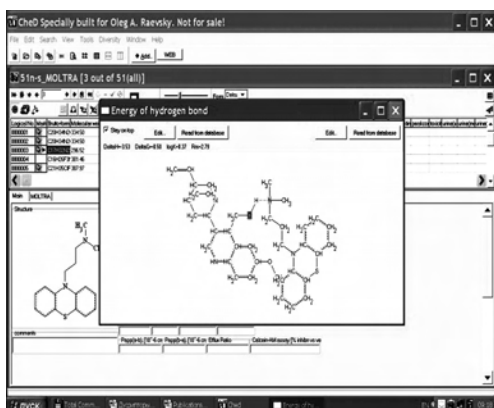


Рис. 2. Программа НУВОТ.

ного связывания. Все это воплотилось в программный комплекс НУВОТ/MOLTRA, Программный комплекс состоит из трех модулей:

- база термодинамических параметров водородной связи (около 16 000 систем);
- база энтальпийных и свободноэнергетических факторов водородной связи (более 50 000 значений);
- программа расчета 32 2D молекулярных дескрипторов и 300 дескрипторов спектров межмолекулярных взаимодействий.

В создании шкалы водородного связывания и программ НУВОТ/MOLTRA приняли участие В.Ю.Григорьев, С.В.Трепалин, Д.Киреев, А.В.Ярков, О.Е.Раевская.

## 2. Оригинальные локальные КССА модели

Установление КССА соотношений для сложных процессов физиологической активности требует создания дискретно-регрессионных моделей. Этой проблемой ОКМД занимается с момента организации отдела. В восьмидесятые годы мы совместно с А.М.Сапегиным создали модели ДИРЕМ и РАСТР (рис. 3, 4).

В 2001 г. О.А.Раевский предложил КССА модель уточненной регрессии, основанную на отборе для каждого соединения ближайших структурных соседей. Затем были созданы модель суперперекрывающихся кластеров, модель AMP, модель LoReP.

Преимуществами локальных моделей по сравнению с глобальными являются:

- возможность вскрыть особенности отдельных групп соединений, которые нельзя установить в глобальных моделях,



Рис. 3. Формирование классификационно-регрессионных локальных КССА моделей.

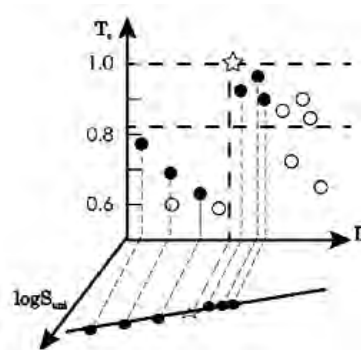


Рис. 4. КССА модель LoReP.

- в локальных моделях каждое изучаемое соединение окружается ближайшими структурными соседями, что необходимо для реализации положения «сходные структуры – сходные свойства»,

- локальные модели позволяют моделировать сложные явления аппроксимацией совокупности простых соотношений с возможностью их интерпретации.

В создании указанных локальных КССА моделей участвовали В.Ю.Григорьев, Д.Е.Полианчик.

## 3. КССА исследования биодоступности лекарств

ОКМД проводит исследования взаимосвязей «структура – биодоступность химических соединений и лекарств» с момента создания отдела.

Созданы КССА модели:

- растворимости лекарств в воде и физиологической среде при  $\text{pH} = 7.4$ , липофильности и абсорбции (программа SLIPPER),

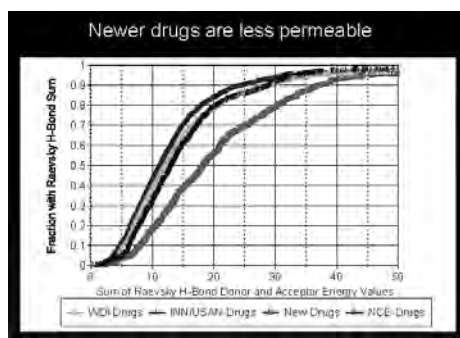


Рис. 5. Пример использования Липинским НУВОТ для оценки проницаемости лекарств.

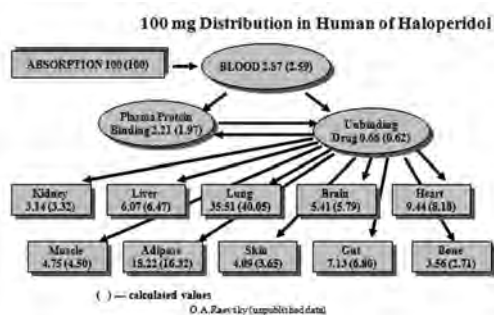


Рис. 6. Пример расчета распределения лекарства в организме человека.

— проницаемости через гематоэнцефалический барьер (программа рассчитывает значения  $\log BVB$ ),

— токсичности химических соединений и лекарств (программа АМР для расчета оральной и внутривенной токсичности).

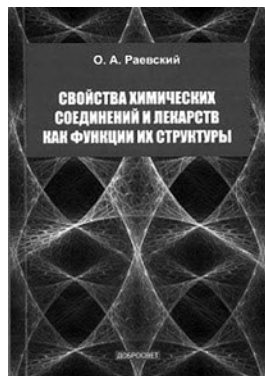
Создана база данных по биологическим испытаниям новых соединений ИФАВ (рис. 5, 6).

Исследования проводятся как с использованием коммерческих программ Sybyl, Dragon, VolSurf, так и программ, созданных в ОКМД, а также оригинальных моделей и дескрипторов.

В исследованиях взаимосвязей «структура – биодоступность» принимали и принимают участие В.Ю.Григорьев, Д.Б.Киреев, Н.В.Лукоянов, А.Н.Раздольский, С.Л.Солодова, В.П.Казаченко, Н.Н.Страхова, А.Д.Мухаметов, О.Е.Раевская.

#### 4. Научные публикации

Настоящая монография посвящена главным образом установлению взаимосвязи между структурой химических соединений и их свойствами как основополагающего принципа компьютерного молекулярного дизайна. Разделы книги включают историю развития этого науч-



ного направления (глава 1), обсуждение различных способов компьютерного описания молекулярной структуры и свойств соединений (глава 2), структурного сходства и разнообразия химических соединений (глава 3), метода структурной и дескрипторной аналогии (глава 4), методов выявления взаимосвязей «структура – свойство» (глава 5). Приводятся и обсуждаются различные классификационные и регрессионные модели «структура – свойство», в том числе и оригинальные модели автора. Описываются литературные и собственные результаты моделирования взаимосвязи «структура – свойство» (растворимость в воде, абсорбция в организме человека, проницаемость через гематоэнцефалический барьер, острая токсичность по отношению к водным организмам и теплокровным).



В настоящей монографии приведены и обсуждаются пятьдесят наиболее примечательных моделей (количественных) соотношений «структура – свойства» (К)ССС, созданных за пятьдесят лет существования этого научно-прикладного раздела компьютерного молекулярного дизайна эффективных соединений. Разделы книги включают введение с описанием развития (К)ССС во всем мире и России (глава 1), пять моделей категорийной и количественной оценки свойств соединений на основе свойств структурных соседей (глава 2), восемь классификационных ССС моделей (глава 3), восемь моделей, основанных на линейных регрессионных соотношениях (глава 4), семь моделей, основанных на нелинейных регрессионных соотношениях (глава 5), десять моделей, основанных на использовании техники с обучением машины (machine learning technique) (глава 6), шесть классификационно-регрессионных КССС моделей (глава 7) и семь моделей, описывающих

Таблица 1. Публикации ОКМД с наибольшим цитированием.

№	Публикация	Цит.	№	Публикация	Цит.
1	ESTIMATION OF BLOOD-BRAIN BARRIER CROSSING OF DRUGS USING MOLECULAR SIZE AND SHAPE, AND H-BONDING DESCRIPTORS. <i>Van De Waterbeemd H., Camenisch G., Folkers G., Chretien J.R., Raevsky O.A.</i> <i>Journal of Drug Targeting</i> . 1998. Т. 6. № 2. С. 151-165.	337	6	ESTIMATING THE WATER SOLUBILITIES OF CRYSTALLINE COMPOUNDS FROM THEIR CHEMICAL STRUCTURES ALONE. <i>McFarland J.W., Avdeef A., Berger C.M., Raevsky O.A.</i> <i>Journal of Chemical Information and Computer Sciences</i> . 2001. Т. 41. № 3-6. С. 1355-1359.	65
2	ESTIMATION OF CACO-2 CELL PERMEABILITY USING CALCULATED MOLECULAR DESCRIPTORS. <i>Van Waterbeemd H.D., Camenisch G., Folkers G., Raevsky O.A.</i> <i>Quantitative Structure-Activity Relationships</i> . 1996. Т. 15. № 6. С. 480-490.	173	7	QUANTITATIVE ESTIMATION OF HYDROGEN BOND CONTRIBUTION TO PERMEABILITY AND ABSORPTION PROCESSES OF SOME CHEMICALS AND DRUGS. <i>Raevsky O.A., Schaper K.J.</i> <i>European Journal of Medicinal Chemistry</i> . 1998. Т. 33. № 10. С. 799-807.	63
3	COMPLETE THERMODYNAMIC DESCRIPTION OF H-BONDING IN THE FRAMEWORK OF MULTIPLICATIVE APPROACH. <i>Raevsky O.A., Grigor'ev V., Kireev D., Zefirov N.</i> <i>Quantitative Structure-Activity Relationships</i> . 1992. Т. 11. С. 49-63.	94	8	QUANTITATIVE ESTIMATION OF DRUG ABSORPTION IN HUMANS FOR PASSIVELY TRANSPORTED COMPOUNDS ON THE BASIS OF THEIR PHYSICO-CHEMICAL PARAMETERS. <i>Raevsky O.A., Fetisov V.I., Trepalina E.P., McFarland J.W., Schaper K.-J.</i> <i>Quantitative Structure-Activity Relationships</i> . 2000. Т. 19. № 4. С. 366-374.	62
4	N-(2-CHLOROPHENYL)BENZENESULFONAMIDE. <i>Perlovich G.L., Raevsky O.A., Tkachev V.V., Schaper K.-J.</i> <i>Acta Crystallographica. Section E: Structure Reports Online</i> . 2006. Т. 62. № 2.	79	9	CROWN ETHER-AMMONIUM COMPLEXES: BINDING MECHANISMS AND SOLVENT EFFECTS. <i>Rüdiger V., Schneider H.-J., Solov'ev V.P., Kazachenko V.P., Raevsky O.A.</i> <i>European Journal of Organic Chemistry</i> . 1999. № 8. С. 1847-1856.	61
5	ДЕСКРИПТОРЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ СТРУКТУРЫ В КОМПЬЮТЕРНОМ ДИЗАЙНЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ. <i>Раевский О.А.</i> <i>Успехи химии</i> . 1999. Т. 68. № 6. С. 555-575. Версии: MOLECULAR STRUCTURE DESCRIPTORS IN THE COMPUTER-AIDED DESIGN OF BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS. <i>Raevsky O.A.</i> <i>Russian Chemical Reviews</i> . 1999. Т. 68. № 6. С. 505-524.	78	10	SLIPPER-2001 - SOFTWARE FOR PREDICTING MOLECULAR PROPERTIES ON THE BASIS OF PHYSICO-CHEMICAL DESCRIPTORS AND STRUCTURAL SIMILARITY. <i>Raevsky O.A., Trepalin S.V., Trepalina H.P., Gerasimenko V.A., Raevskaja O.E.</i> <i>Journal of Chemical Information and Computer Sciences</i> . 2002. Т. 42. № 3. С. 540.	56

межмолекулярные взаимодействия (глава 8). Требования, предъявляемые к (К)ССС моделям и подробный обзор типичных ошибок, возникающих при их построении представлен в заключительной главе 9.

В табл. 1 приведены 10 (из 400) статей с наибольшим цитированием.

##### 5. Созданные оригинальные компьютерные программы для проведения КССА исследований

**HYBOT** (Hydrogen Bond Thermodynamics) program package, Raevsky, O.A., Grigor'ev, V.Ju., Trepalin, S.V., *Registration by Russian State Patent Agency* N 990090 of 26.02.99;

**HYBOT in UNIX/LINUX**, Raevsky, O.A., Skvortsov, V.S., Grigor'ev, V.Ju., Trepalin, *Registration by*

*Russian State Patent Agency* N 2002610496 of 05.02.02;

**DISCON** (Dissociation Constants) program package, Raevsky, O.A., Trepalin, S.V., Raevskaya O.E., Fetisov V.I., *Registration by Russian State Patent Agency* N 990091 of 26.02.99;

**MOLDIVS** (Molecular Diversity & Similarity) program Package, Raevsky, O.A., Gerasimenko V.A., Trepalin S.V. *Registration by Russian State Patent Agency* N 0990093 of 26.02.99;

**SLIPPER** (Solubility, LIPOphilicity & Permeability) program package, Raevsky, O.A., Trepalin, S.V., Trepalina, E.P., *Registration by Russian State Patent Agency* N 0990089 of 26.02.99;

**BALPS** (Bioavailability, Absorption, LIPOphilicity, Permeability, Solubility), Raevsky, O.A., Trepalin, S.V., Trepalina, E.P., Raevskaya O.E., *Registration*

by Russian State Patent Agency N 2002610438 of 26.02.2002

**BIODOST** program package, Raevsky, O.A., Kasachenko I.V., Raevskaya O.E., Registration by Russian State Patent Agency N 20036112669 of 09.12.2003

**3D HYBOT**, Registration by Russian State Patent Agency N 2004612207 of 27.09.2004

**MedChemDesk** (MEDicinal CHEMical DESK), O.A.Raevsky, V.S.Skvortsov, .E.Raevskaja, Registration by Russian State Patent Agency N 2004612206 of 27.09.2004

**CHEMS**, Database on solubility and other physicochemical properties (O.A.Raevsky, K.-J.Schaper, O.E.Raevskaja, V.S.Skvortsov, S.V.Trepalin).

## 6. Иностранные соавторы (в скобках указано число совместных статей)

Prof. Dr. H.-J.Schneider, University of Saarbrücken, Germany (6), Prof. Dr. J.K.Chretien, University of Orleans, France (3), Dr. H.van de Waterbeemd, F. Hoffmann-La Roche Ltd, Switzerland (3), Prof.Dr. J.Dearden, University John Moore, Liverpool, England (8), Dr. J.McFarland, Physer, Groton, USA (5), Dr. E.E.Weber,

Environmental Protection Agency (EPA), USA (2), Prof. Dr. R.Mannhold, University of Dusseldorf, Germany (4), Dr. A.Worth, EU Joint Research Centre, Ispra, Italy (3).

## 7. Международные встречи



Встреча на Рейне (июль 1993). Семинар по водородной связи. Слева направо: проф. Лоуренс (Франция), проф. Керри (США), проф. Шнайдер (Германия), проф. Абрахам, проф. Раевский (Россия).



Российская экспозиция компьютерных технологий на Hannover Messe, октябрь 1996 г.

Слева — начальник Управления информационных технологий Миннауки В.В.Бойко.



Заключительная встреча руководителей и коллабораторов проекта МНТЦ № 3777, Ливерпуль, Англия, август 2010. Стоят слева направо: д-р. Вортц (Объединенный Исследовательский центр Евросоюза, Италия), проф. J. Dearden (Университет Джон Мура, Ливерпуль, Англия), проф. Поройков (ИБМХ, Москва).



Заседание Правления Международного общества QSAR & Modelling Society, Бостон (США), август 1995. Слева направо: проф. Кинг (США), проф. Чартон (США), др. Маги (США), проф. Раевский (Россия) и проф. Блок (США).



# Особенности строения некоторых бензокраун-эфиров (ЯМР-исследования)

В.О.Завельский,<sup>1</sup> В.П.Казаченко<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Лаборатория прикладной спектроскопии ИФАВ РАН

<sup>2</sup> Группа термодинамики межмолекулярных взаимодействий ИФАВ РАН

Структура краун-эфиров, их поведение в растворах и, в особенности, процессы комплексообразования давно уже стали предметом многочисленных исследований, однако, несмотря на большое количество исследований в этой области, до полной ясности далеко.

Метод ядерного магнитного резонанса (ЯМР) представляет в этом плане определенные преимущества [1, 2], поскольку дает возможность наблюдать брутто-эффект комплексообразования и следить за отдельными центрами координации. Весьма полезным в этом плане представляется понижение симметрии лиганда, поскольку делает в нем «ЯМР-различимыми» атомы, участвующие в комплексообразовании. Бензо-краун-эфиры (БКЭ) такое снижение симметрии по сравнению с незамещенными макроциклами обеспечивают. Еще большую асимметрию вносит в молекулу краун-эфира введение в нее ацетильного фрагмента.

Бензо-краун-эфиры — типичные полиденватные системы с формально одинаковыми эфирными атомами кислорода (рис. 1, 2). Тем не менее наличие при макроцикле бензольного кольца может повлиять в различной степени на электронодонорные функции эфирных атомов кислорода и тем самым сказаться на их комплексообразующей способности. С этой точки зрения представляет интерес изучение механиз-

мов взаимодействия бензо-краун-эфиров с катионами металлов методом спектроскопии ЯМР  $^{17}\text{O}$ , поскольку атомы кислорода непосредственно участвуют в процессе комплексообразования. Следует подчеркнуть, что для детального изучения механизма комплексообразования методом ЯМР  $^{13}\text{C}$  первым и неизменным условием является точное отнесение сигналов. Поэтому для проверки и уточнения полученных ранее результатов [2] мы провели изучение бензо-12- и бензо-15-краун-эфиров (Б12к4, Б15к5) и их ацетильных производных методом ЯМР  $^{13}\text{C}$  с селективной развязкой от протонов, а также получили константы спин-спинового взаимодействия (КССВ) протонов в спектрах протонного магнитного резонанса (ПМР) исследуемых соединений.

Синтез, очистка и приготовление образцов описаны в работе [2]. Растворитель — дважды перегнаный  $\text{CD}_3\text{CN}$ . Эксперименты проводились при постоянной температуре  $T = 291 \pm 1$  К. Спектры ПМР, ЯМР  $^{17}\text{O}$  и  $^{13}\text{C}$  (частоты 200, 27.1 и 50.3 МГц соответственно) получены на импульсном фурье-спектрометре ЯМР СХР-200 фирмы Брукер. В спектрах ПМР, и в спектрах ЯМР  $^{13}\text{C}$  в

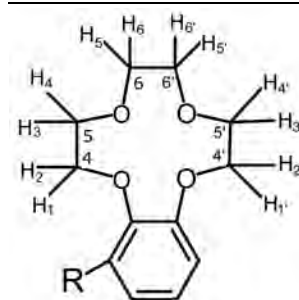


Рис. 1. Бензо-12-краун-4 (Б12к4). R — H, ацетил; I — Б12к4, II — Ас-Б12к4.

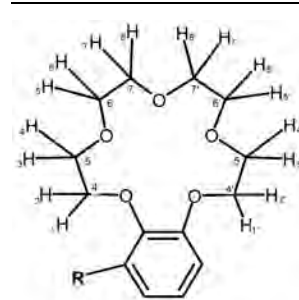


Рис. 2. Бензо-15-краун-5 (Б15к5). III — Б15к5, IV — Ас-Б15к5.

**В.О.Завельский.** Кандидат физико-математических наук, главный научный сотрудник, заведующий лабораторией прикладной спектроскопии ИФАВ РАН.

e-mail: zvl@ipac.ac.ru

**В.П.Казаченко.** Старший научный сотрудник группы термодинамики межмолекулярных взаимодействий ИФАВ РАН.

e-mail: kazach@ipac.ac.ru

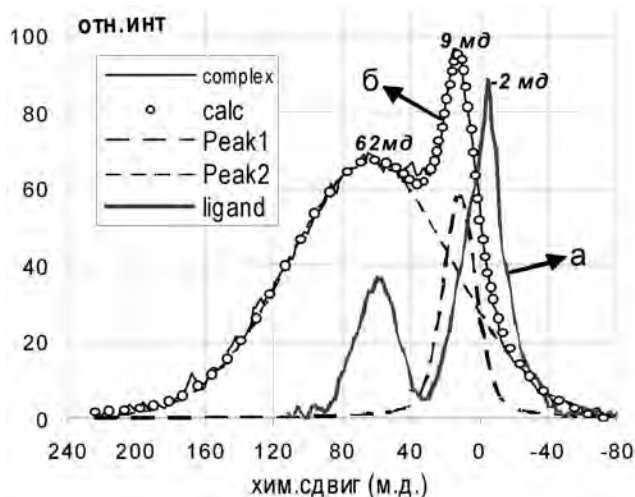


Рис. 3. Спектр ЯМР  $^{17}\text{O}$  Б15к5 (а), его комплекса с  $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$  (б) и разделение спектра комплекса на два сигнала (пунктир). Точки — расчетный спектр комплекса.

качестве внутреннего стандарта использовали TMS, а в спектрах ЯМР  $^{17}\text{O}$  —  $\text{D}_2\text{O}$ .

С образованием комплекса в спектре ЯМР  $^{17}\text{O}$  Б15к5 сигнал атомов кислорода эфирных групп при постоянной ширине сдвигается на  $\sim 11$  м.д. в слабое поле, а сигнал анизольных атомов кислорода остается на месте и уширяется в  $\sim 5$  раз (рис. 3).

При комплексообразовании  $sp^2$ -гибридизованные орбитали НЭП атомов кислорода эфирных групп передают свою электронную плотность к иону кальция. Это приводит к дезэкранированию атомов кислорода эфирных групп и сдвигу соответствующего сигнала в слабое поле.  $p$ -Орбитали НЭП анизольных атомов кислорода лишь деформируются, ориентируясь в сторону ионов кальция. Это приводит к резкому увеличению градиента электрического поля на ядрах анизольных атомов кислорода и пятикратному уширению сигнала ЯМР  $^{17}\text{O}$  этих атомов без изменения величины его химического сдвига.

На основе данных ЯМР  $^{17}\text{O}$  авторами работы [2] было проведено предварительное отнесение сигналов ЯМР  $^{13}\text{C}$  в макроцикле по крутизне зависимости химического сдвига (ХС) сигналов ЯМР  $^{13}\text{C}\{\text{H}\}$  углеродных атомов макроциклического кольца в зависимости от концентрации металла.

Спектры ЯМР  $^{13}\text{C}$  были получены в двух режимах — в режиме широкополосного шумо-

вого облучения исследуемых объектов на частоте протонного резонанса для полного подавления углерод-протонных скалярных спин-спиновых взаимодействий (ССВ) (развязка от протонов) и

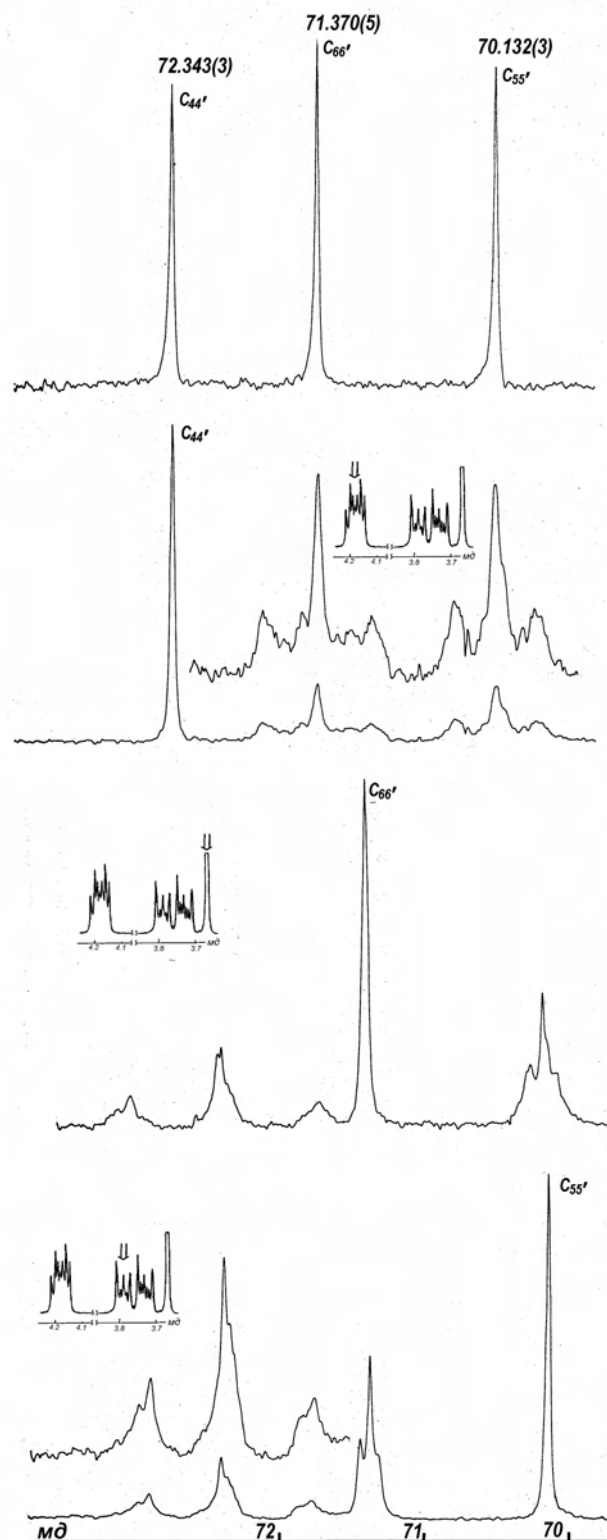


Рис. 4. Спектры ЯМР  $^{13}\text{C}\{\text{H}\}$  Б12к4, полученные в режиме широкополосного подавления С–Н ССВ (вверху) и в режиме селективной развязки от протонов.

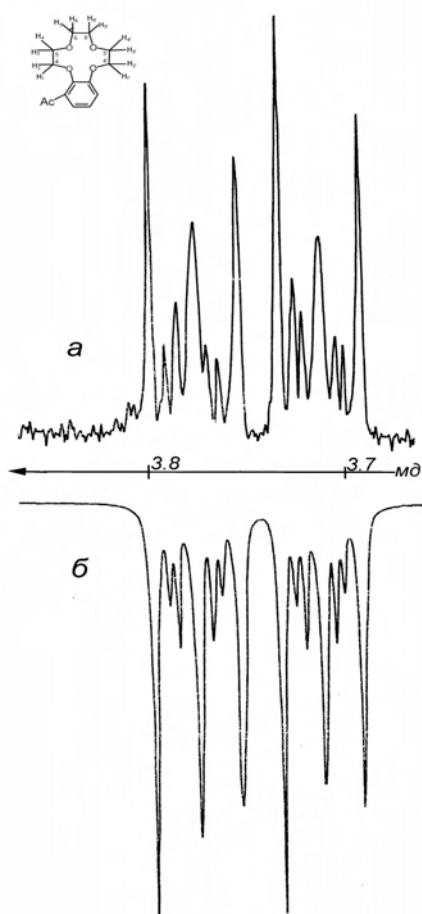


Рис. 5. Экспериментальный (а) и расчетный фрагменты ПМР-спектра Ас-Б15С5.

в режиме выборочного (селективного) подавления углерод-протонных ССВ (селективная раз-

вязка от протонов — СРП) в отдельных метиленовых фрагментах макроцикла.

В таком режиме в спектрах ЯМР  $^{13}\text{C}$  наблюдается узкий синглет от углерода облученного метиленового фрагмента, в котором углерод-протонное ССВ подавлено почти полностью, и широкие неразвязанные сигналы в виде слабо разрешенных триплетов от остальных атомов углерода макроцикла.

Пример схемы эксперимента и полученные в результате спектры приведены на рис. 4. На каждом из спектров ЯМР  $^{13}\text{C}$  в уменьшенном масштабе приведен ПМР-спектр, на котором стрелкой указан сигнал того метиленового фрагмента, в котором осуществляется подавление углерод-протонного ССВ.

ХС и КССВ протонов БКЭ и их комплексов с ионом  $\text{Ca}^{2+}$  получены расчетом из экспериментальных спектров с применением итерационной программы PANIC — варианта программы LAOCOON, адаптированного к ЭВМ Aspect-2000 фирмы Брукер [3].

Для расчетов мы предположили полное отсутствие ССВ между протонами эфирных мостиков в макроцикле и, таким образом, рассчитали протонную четырехспиновую систему типа  $\text{AA}'\text{BB}'$ .

Пример расчетного фрагмента ПМР-спектра и его сопоставление с экспериментом приведены на рис. 5. Расчетные ХС и КССВ протонов в исследуемых БКЭ приведены в табл. 1–3. Обменные процессы при комплексообразовании

Таблица 1.

Соединение	Хим. сдвиг, м.д.				КССВ, Гц					
	$\delta_1, \delta_{1'}$	$\delta_2, \delta_{2'}$	$\delta_3, \delta_{3'}$	$\delta_4, \delta_{4'}$	${}^2J_{12/1'2'}$	${}^2J_{34/3'4'}$	${}^3J_{13/24}$	${}^3J_{1'3'}$	${}^3J_{14}$	${}^3J_{1'3'/2'4'}$
Б12к4	3.734	3.734	4.108	4.108	-13.05	-14.20	2.16	2.16	6.34	6.34
комплекс	3.95	3.95	4.46	4.46	-15.8	-15.5	2.8	2.8	6.6	6.6
АсБ12к4	3.718	4.184	3.781	4.197	-16.0	-15.0	2.2		6.2	6.4

Таблица 2.

Соединение	Хим. сдвиг, м.д.				КССВ, Гц				
	$\delta_1, \delta_2$	$\delta_3, \delta_4$	$\delta_{1'}, \delta_{2'}$	$\delta_{3'}, \delta_{4'}$	${}^2J_{12/1'2'}$	${}^2J_{34/3'4'}$	${}^3J_{13/24}$	${}^3J_{14} {}^3J_{23}$ ${}^3J_{1'4'} {}^3J_{2'3'}$	${}^2J_{1'3'/2'4'}$
АсБ15к5	3.80	4.11	3.81	4.13	-15.0	-16.0	6.3	2.5	6.1
Комплекс	3.88	4.19	3.88	4.19	-13.5	-13.3	6.3	2.9	6.3

Таблица 3.

Соединение	Хим. сдвиг, м.д.				КССВ, Гц			
	$\delta_5, \delta_6$	$\delta_{5'}, \delta_{6'}$	$\delta_7, \delta_8$	$\delta_{7'}, \delta_{8'}$	${}^2J_{56}$	${}^2J_{78}$	${}^3J_{57}{}^3J_{68}$	${}^3J_{14}{}^3J_{23}$
Б15к5	3.40	3.40	3.43	3.43	-12.38	-12.38	3.1	6.3

размывают структуру метиленовых мультиплетов в ПМР-спектрах. Это существенно осложняет расчеты, однако при небольших отношениях металл – лиганд все же возможно вычислить величины химических сдвигов и КССВ  ${}^2J_{\text{НН}}$ ,  ${}^3J_{\text{НН}}$ .

При отнесении сигналов в спектрах ПМР изучаемых БКЭ мы придерживались общепринятой схемы (см., например, работу [4]), согласно которой протоны, находящиеся вне конуса экранирования бензольного кольца, испытывают сильнополюсное смещение тем большее, чем ближе к кольцу они находятся. Таким образом, мультиплеты в области 4 м.д. принадлежат протонам  $\text{H}_{44'}$ , мультиплеты в области 3.8 м.д. — протонам  $\text{H}_{55'}$  и, наконец, мультиплет в области 3.6 м.д. обязан своим происхождением протонам  $\text{H}_{66}$  и  $\text{H}_{77'}$ . В ПМР-спектрах соединений II и IV протоны  $\text{H}_{66'}$  представлены достаточно узким синглетом, что указывает на их практически полную химическую и магнитную эквивалентность.

Введение ацетильного заместителя заметно усложняет спектры ПМР, однако последующий сравнительный анализ протонных спектров и селективных спектров ЯМР  ${}^{13}\text{C}$  позволяет сделать достаточно конкретные выводы по отнесению сигналов в ПМР-спектрах соединений II и IV (подробнее об этом см. ниже).

Эксперименты по селективной развязке от протонов (СРП) в соединениях I и III в целом подтверждают попарные отнесения, сделанные в [2]. Так, наиболее проблематичным была идентификация сигналов углеродов  $\text{C}_{55'}$  и  $\text{C}_{66'}$  в соединении I. Для сделанного в работе [2] отнесения главным критерием была крутизна зависимостей ХС  $\text{C}_{55'}$  и  $\text{C}_{66'}$  от концентрации металла. Чем она больше, т.е. чем сильнее специфическое влияние комплексообразования на ХС, тем больше сдвинут сигнал некоординированного углерода в сильное поле. СРП-Эксперименты подтверждают такое отнесение: при облучении протонов  $\text{H}_{55'}$  узким синглетом в спектре  ${}^{13}\text{C}$

проявляется самый слабополюсный сигнал при 69.7 м.д., отнесенный в работе [2] к атому углерода  $\text{C}_{55'}$ , а при облучении протонов  $\text{H}_{66'}$  — синглет при 71.11 м.д., приписанный в исследовании [2], согласно механизму комплексообразования, атому углерода  $\text{C}_{66'}$ .

В соединениях II и IV селективная развязка от протонов позволила выделить в спектрах ЯМР  ${}^{13}\text{C}$  пары сигналов  $\text{C}_{\text{N}}$  и  $\text{C}_{\text{N}'}$ , на которые расщепился сигнал  $\text{C}_{\text{NN}'}$  в незамещенных БКЭ из-за исчезновения оси симметрии при введении ацетила в положение 1. Величина расщепления  $\text{C}_{\text{NN}'}$  в  $\text{C}_{\text{N}}$  и  $\text{C}_{\text{N}'}$  (табл. 4) может служить мерой эффекта заместителя, а расположение сигналов  $\text{C}_{\text{N}}$  и  $\text{C}_{\text{N}'}$  относительно сигнала  $\text{C}_{\text{NN}'}$  симметричной структуры дает информацию к отнесению сигналов в парах ( $\text{C}_{\text{N}}$ ,  $\text{C}_{\text{N}'}$ ). Действительно здесь мы сталкиваемся с двумя противоположно влияющими на ХС факторами: влиянием заместителя и альтернативой заряда в бензольном кольце. Действие первого состоит в том, что сдвиг сигнала углерода в *para*-положении  $\text{C}_{\text{N}}$  от сигнала симметричной структуры  $\text{C}_{\text{NN}'}$  больше, чем сдвиг сигнала атома углерода  $\text{C}_{\text{N}'}$  в *meta*-положении. Альтернатива заряда дает противоположный эффект. Другими факторами, ввиду их малости, можно пренебречь.

Данные, имеющиеся в литературе (см., например, работу [4]), свидетельствуют о том, что атом кислорода, присоединенный непосредственно к бензольному кольцу, практически полностью нивелирует влияние альтернативы заряда на ХС следующих за кислородом углеродных

Таблица 4. Химический сдвиг относительно ТМС, м.д.

Атом углерода	Б12к4	Ас-Б12к4	Б15к5	Ас-Б15к5
1	122.16	131.75	121.42	130.7
1'		124.61	121.42	123.6
2	118.16	118.65	114.30	112.8
2'		115.81	114.30	111.9
3	150.87	150.28	149.28	148.9
3'		155.40	149.28	153.6
4,4'	71.75		69.07	
5,5'	70.93		69.65	
6,6	69.77		70.57	
7,7'			71.1	

**Таблица 5.** Хим.сдвиги ЯМР  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  атомов углерода макроциклического кольца ( $\delta$ , м.д.) в Ас-Б12к4 и Ас-Б15к5.

Соединение	$(\delta, \text{м.д.})$						
	C(4)	C(4')	C(5)	C(5')	C(6)	C(6')	C(7,7')
Ас-Б12к4	72.78	71.48	71.,04	70.82	69.84	69.70	
Ас-Б15к5	71.11	70.38	70.28	69.34	69.20	68.91	68.60

**Таблица 6.** Константы спин-спинового взаимодействия  $^1J_{\text{C-H}}$  в соединениях Б12к4 и Б15к5.

Связь	$^1J_{\text{C-H}}, \text{Гц}$	
	Б12к4	Б15к5
C(4)–H	$145.0 \pm 0.5$	$143.8 \pm 0.3$
C(5)–H	$142.0 \pm 0.5$	$141.3 \pm 0.3$
C(6)–H	$141.0 \pm 0.5$	$141.3 \pm 0.3$
C(7)–H	–	$141.3 \pm 0.3$

атомов. Поэтому при отнесении сигналов  $^{13}\text{C}$  в парах ( $\text{C}_\text{N}$ ,  $\text{C}_\text{N}'$ ) мы учитывали только влияние заместителя (табл. 4–6).

Величины химических сдвигов макроциклических атомов углерода в ацетил-замещенных краун-эфирах вынесены в отдельную таблицу (табл. 5)

Поскольку ацетильная группа является акцептором электронов, ее влияние сдвигает сигнал в слабое поле. Именно такая ситуация наблюдается в рассматриваемом случае

В спектре ПМР соединения IV протоны  $\text{H}_{66'}$  и  $\text{H}_{77'}$  представлены неразделяемым мультиплетом. Поэтому при облучении этих протонов в спектре  $^{13}\text{C}$  выделяются сигналы обоих атомов углерода:  $\text{C}_{66'}$ , и  $\text{C}_{77'}$ . В этом случае отнесение сигналов удастся провести, слегка смещая частоту облучения относительно центра мультиплета ( $\text{H}_{66'}$ ,  $\text{H}_{77'}$ ) в ПМР-спектре либо в сильное, либо в слабое поле, т.е. воздействуя в большей мере либо на  $\text{H}_{66'}$ , либо на  $\text{H}_{77'}$ . Тогда в результате недоразвязки и уменьшения эффекта Оверхаузера один из сигналов атомов углерода — соответственно  $\text{C}_{66'}$ , или  $\text{C}_{77'}$  — имеет заметно меньшую интенсивность и слабо выраженную триплетную форму.

Обращает на себя внимание тот факт, что смещая частоту облучения в слабое поле (т.е. акцентируя облучение на одном из протонов пары  $\{\text{H}_{66'}, \text{H}_{77'}\}$ ), мы выделяем сильнополюсный сигнал в паре  $\{\text{C}_{66'}, \text{C}_{77'}\}$  и наоборот.

Наиболее простое объяснение этого явления состоит, по-видимому, в том, что протоны  $\text{H}_{77'}$  заметно выходят из плоскости бензольного кольца и, возможно, даже попадают в его конус дезэкранирования (на возможность этого указывают расчеты, см. рис. 5). Тогда пространственное влияние заместителя и дезэкранирующее влияние ароматического кольца сдвигают сигнал  $\text{H}_{66'}$  в слабое поле относительно сигнала  $\text{H}_{77'}$ .

Хорошее совпадение расчетных и экспериментальных ПМР-спектров подтверждает предположение об отсутствии протонных ССВ между мостиковыми фрагментами в макроциклах. Найденные значения  $^3J_{\text{HH}}$  указывают на гош-конформацию мостиков в соединениях.

Обменные процессы при комплексообразовании размывают структуру метиленовых мультиплетов в ПМР-спектрах. Это существенно осложняет расчеты, однако при небольших отношениях металл–лиганд все же удастся вычислить величины химического сдвига,  $^2J_{\text{HH}}$ ,  $^3J_{\text{HH}}$ .

Ход концентрационных зависимостей химического сдвига  $^{13}\text{C}$  от соотношения металл–лиганд, а также значения химического сдвига,  $^2J_{\text{HH}}$ ,  $^3J_{\text{HH}}$  указывают на то, что при комплексообразовании происходит уплощение макроциклического кольца с сохранением гош-конформации мостиков.

## Литература

1. В.О.Завельский, В.П.Казаченко, В.П.Новиков, В.П.Соловьев, О.А.Раевский. *Кординационная химия*, **12** (8), 1060–1062 (1986)
2. В.П.Казаченко, В.О.Завельский, И.И.Булгак, О.А.Раевский. *Изв. АН СССР. Сер. хим.*, (3), 532–536 (1988)
3. *Manual NMR-spectrometer CXP-200*
4. Х.Гюнтер. *Введение в курс спектроскопии ЯМР*, Мир, Москва, 1984

# О природе сингулярностей в спектрах ПМР органических поликристаллов

В.О.Завельский

Лаборатория прикладной спектроскопии ИФАВ РАН

В спектрах протонного магнитного резонанса (ПМР) целого ряда органических поликристаллов наблюдаются сингулярности в центре линии поглощения в виде весьма узких ( $\sim 100$  Гц) по сравнению с обычной ( $\sim 10$  кГц) шириной сигнала ПМР в твердой фазе. Время спин-решеточной релаксации  $T_1$  протонов, образующих сингулярности,  $T_{1s} \sim 0.1$  с намного меньше  $T_{1N} \sim 10^3$  с ординарных протонов, формирующих основной сигнал. На кривой спада свободной прецессии (ССП) сингулярности проявляются как примесь экспоненциальной компоненты. Аналогичная экспоненциальная компонента обнаружена также в ССП ЯМР  $^{19}\text{F}$  ионного кристалла  $\text{CaF}_2$  [1].

Предсказываемое теорией поведение классического вектора макроскопической намагниченности состоит в том, что при  $\tau < T_1$  следует ожидать лишь уменьшения интенсивности ССП. Эксперимент обнаруживает в ССП появление заметной экспоненциальной компоненты (рис. 1а,с) при накоплении ССП последовательностью  $90^\circ$ -импульсов, временные интервалы  $\tau$  между которыми удовлетворяют условию  $T_2 \ll \tau < T_1$  ( $T_2$  — время ядерных спин-спиновых взаимодействий). Выполнение условия  $T_2 \ll \tau < T_1$  приводит спиновую систему в состояние, которое можно определить как «импульсное насыщение». Полученные кривые (рис. 1) хорошо описываются эмпирическим выражением (1), основанным на провоторовской теории релаксации [2]:

$$G(t) = \exp\{i(\chi - \chi_n)t\} \{f(\chi - \chi_n)[1 + C_1(1 + C_2 \cdot (\chi - \chi_n)^2)f(\chi - \chi_n)]^{-1}d\chi, \quad (1)$$

где  $\chi_n$  — ядерная ларморова частота,  $C_1, C_2$ , — варьируемые параметры,  $f(\chi - \chi_n)$  — форма линии ЯМР, записанная в равновесных условиях  $\tau \div 5 T_1$ . К сожалению, физическое содержание параметров  $C_1$  и  $C_2$  пока непонятно.

Очень интересный тип сингулярности в спектрах ЯМР  $^1\text{H}$  — узкие пики в центре широких линий протонных спектров органических кристаллов — были замечены при появлении импульсных Фурье-спектрометров ЯМР. В течение длительного времени узкие сигналы объяснялись остаточной влагой в образцах, а потому специальным изучением этих сигналов исследователи не занимались.

Узкие сигналы обнаружены автором с сотрудниками в ПМР-спектрах поликристаллических пятичленных полиазотистых гетероциклов — азолов (рис. 2) [3]. Экспериментальные значения второго момента  $M_2$  широких линий в имидазоле составляют  $10.5 \pm 0.6 \text{ Э}^2$  ( $190 \pm 11 \text{ КГц}^2$ ) в бензотриазоле —  $12.3 \pm 0.7 \text{ Э}^2$  ( $220 \pm 14 \text{ КГц}^2$ ), в пиразоле  $13.1 \pm 0.6 \text{ Э}^2$  ( $240 \pm 11 \text{ КГц}^2$ ). В абсолютно жесткой структуре значения  $M_2$  не менее  $25 \text{ Э}^2$  ( $450 \text{ КГц}^2$ ) — в основном за счет межмолекулярных взаимодействий. В имидазоле теоретический второй момент жесткой решетки  $M_{2\text{теор}}$  составляет  $\sim 35 \text{ Э}^2$  ( $635 \text{ КГц}^2$ ). В имидазоле при  $T = 77 \text{ К}$  экспериментальный  $M_2 = 31.9 \pm 3.3 \text{ Э}^2$  ( $580 \pm 60 \text{ КГц}^2$ ), что хорошо согласуется с теоретическим значением. Для уменьшения  $M_{2\text{теор}}$  до экспериментального значения достаточно усреднения  $M_2$  по торсионным колебаниям гетероциклов в Н-связанной цепочке вокруг оси N—N на угол  $\varphi = 45^\circ$ . Эти реориентации обеспечивают релаксацию цепочки Н-свя-

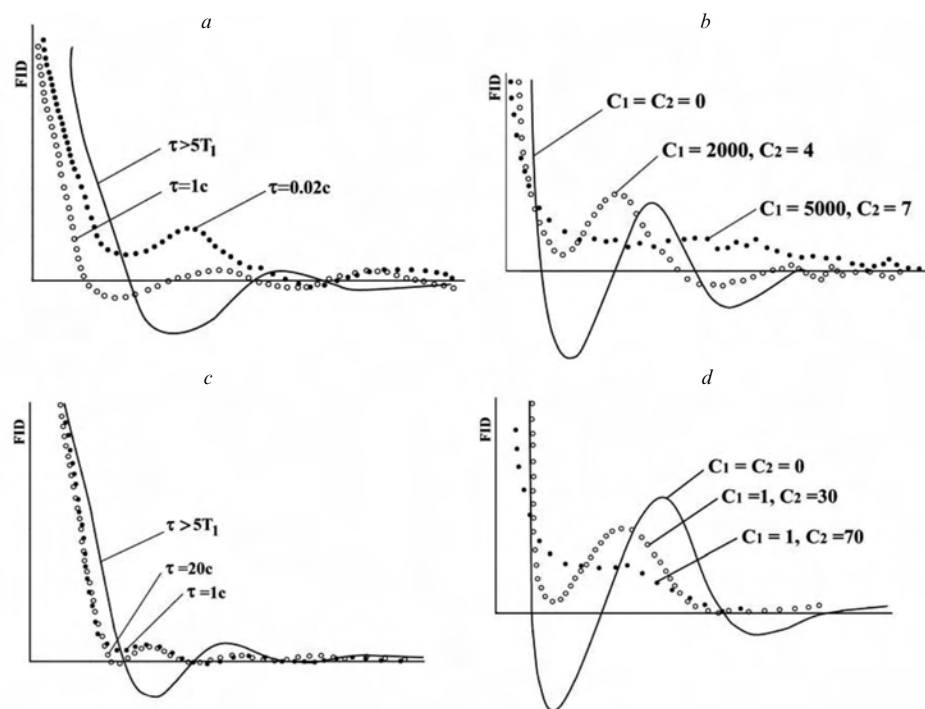


Рис. 1. Спад свободной прецессии ССП: *a* —  $\text{CaF}_2$  ( $^{19}\text{F}$ ), эксперимент; *b* —  $\text{CaF}_2$  ( $^{19}\text{F}$ ), расчет по формуле (1); *c* — нафталин ( $^1\text{H}$ ), эксперимент; *d* — нафталин ( $^1\text{H}$ ), расчет по (1).

занных гетероциклов к первоначальному состоянию после акта переноса протона.

Времена спин-решеточной релаксации протонов, формирующих широкие линии в спектрах исследуемых азолов, очень велики —  $T_{1W} \sim 10^3$  с ( $\sim 1000$  с в имидазоле,  $\sim 650$  с в бензотриазоле). Протоны сингулярностей (узкий сигнал в спектрах) имеют времена релаксации  $T_{1N} \sim 10^{-2} - 10^{-1}$  с — на несколько порядков меньше, чем у ординарных протонов. В режиме накопления ССП последовательностью когерентных  $90^\circ$ -

импульсов со скважностью  $\tau T_{1W} \gg \tau \gg T_{1N}$  (частотная развертка 20–50 КГц) сигнал ординарных протонов в спектре практически отсутствует, а узкая компонента проявляется с хорошим разрешением. Спектры, полученные в таком режиме, при значениях постоянного внешнего магнитного поля  $H_0$  — 2.114 и 4.697 Тл (резонансные частоты протонов 90 и 200 МГц соответственно) приведены на рис. 3.

Узкие сигналы представляют собой триплеты с компонентами различной интенсивности. Расщепление и ширина линий в триплетях растут пропорционально увеличению  $H_0$ . Значения расщеплений (порядка нескольких м.д.), а также зависимость (в Гц) величин расщепления от  $H_0$ , позволяют предположить, что небольшая часть протонов образца попадает в такие условия, когда векторные межпротонные диполь-дипольные взаимодействия усредняются практически до нуля. При этом линия поглощения, ширина которой в твердых телах обусловлена главным образом именно диполь-дипольным взаимодействием, резко сужается, и в спектре проявляются гораздо более слабые химические и(или) координационные различия протонов гетероциклов. Соотношение интегральных интенсивностей компонент триплетов в имидазоле

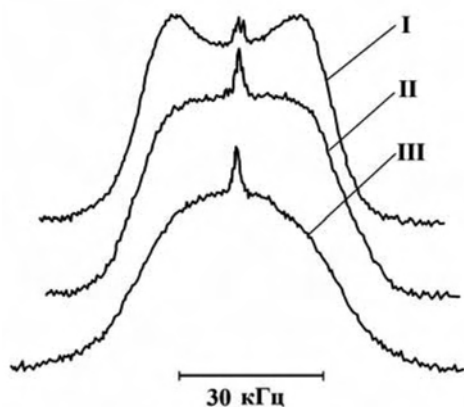


Рис. 2. Спектры ПМР азолов: I — пиразол (PzH), II — имидазол (ImH), III — бензотриазол (BtH).

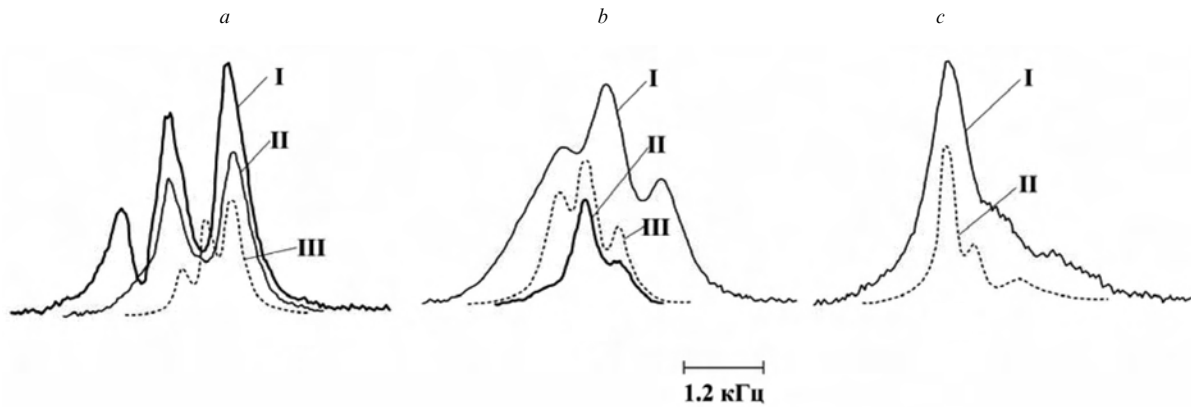
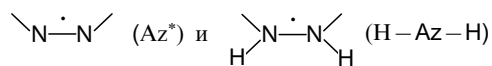


Рис. 3. Узкие сигналы в спектрах ПМР азолов при  $T = 291$  К. *a* — пиразол I — PzH (200 МГц), II — 3-D-PzH (200 МГц), III — PzH (90 МГц); *b* — имидазол I — ImH (200 МГц), II — 2-D-ImH (200 МГц), III — ImH (90 МГц); *c* — бензотриазол I — BtH (200 МГц), II — BtH (90 МГц).

2:1:2 и пиразоле 1:2:2 не соответствует количеству протонов в отдельных молекулах как имидазола, так и пиразола. Это, возможно, связано с образованием Н-связанных цепочек гетероциклов. Для объяснения почти полного исчезновения диполь-дипольных локальных полей у некоторых групп спинов использована рассмотренная выше модель взаимодействия ядерных спинов с парамагнитными центрами в кристалле. На это указывает, в частности, резкое (на несколько порядков) уменьшение времени спинрешеточной релаксации  $T_{1N}$ -протонов, формирующих узкий сигнал в спектрах азолов. Наиболее эффективным механизмом ядерной релаксации в твердых телах является электронно-ядерное контактное сверхтонкое взаимодействие. В молекулярном кристалле парамагнитным центром может служить достаточно жестко локализованный неспаренный электрон. В исследуемых веществах можно предположить наличие небольшой стационарной концентрации короткоживущих радикалов типа



Концентрация таких радикалов очень мала, время корреляции неспаренного электрона  $\tau_e$  полностью определяется электронным спинрешеточным взаимодействием и лежит в пределах  $10^{-8} \gg \tau_e \gg 10^{-12}$ . Ядерные спины, расположенные на расстоянии  $r$  от неспаренного электрона, хаотически переориентируются в результате взаимодействия со спином электрона с

частотой  $\omega_N = Cr^{-6}$ , где параметр  $C$  определяется формулой

$$C = 0.4 (\gamma_N g \beta)^2 S(S+1) \tau_e [1 + (\omega + \tau)^2]^{-1},$$

в которой  $\beta$  — магнетон Бора,  $\gamma_N$  — гиромагнитное отношение ядерного спина,  $g$  — фактор парамагнитного иона,  $S$  — его спин,  $\tau_e$  — время корреляции величины  $S_Z$  [1].  $C/2r^6$  — вероятность (в единицу времени) релаксационной переориентации ядерного спина, расположенного на расстоянии  $r$  от точки локализации неспаренного электрона. При  $\omega_N > 1/T_2$  ( $T_2 = 1/\pi\Delta H$ , время протонной спин-спиновой релаксации,  $\Delta H$  — ширина линии) такие хаотические переориентации приведут к усреднению локальных ядерных магнитных полей и к практически полному исчезновению диполь-дипольных взаимодействий между ядерными спинами. Их температура при этом становится равной температуре решетки. Эффективный радиус области, содержащей такие «холодные» (т.е. имеющие температуру решетки) спины,  $R = 0.68 (C/D)^{1/4}$ , где  $D \sim 10^{-12} \text{ см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$  — коэффициент спиновой диффузии. Локализуя неспаренный электрон в центре гетероцикла и считая его время корреляции равным  $10^{-9}$  с, получаем  $R \approx 5 \text{ \AA}$ . Однако не все протоны, попадающие в эту «холодную» область, имеют частоты реориентаций, удовлетворяющие условию  $\omega_N \gg 1/T_2$ . Так, для спинов соседних гетероциклов, находящихся на расстоянии  $r \sim 4.5 \text{ \AA}$  от электрона,  $\omega_N \sim 3 \cdot 10^3$ , что на 2.5 порядка меньше, чем  $1/T_2 \sim 10^5$ . Сигнал от этих протонов не входит в узкую компоненту.



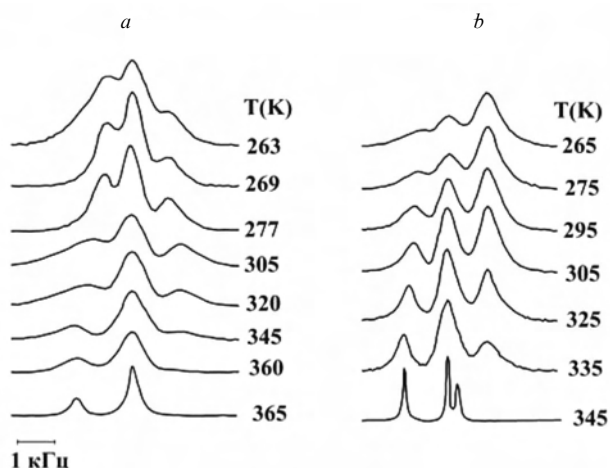


Рис. 4. Температурная эволюция узкой компоненты протонного спектра (200 МГц) имидазола (а) и пиразола (b).

Таким образом, реально ответственными за узкую линию являются лишь протоны того гетероцикла, на котором локализуется неспаренный электрон. Для них  $r \sim 2.24 \text{ \AA}$  и  $\omega_N \sim 2 \cdot 10^5$ .

На это указывает спектр расплава имидазола, в котором присутствуют только две линии. Интегральные интенсивности этих линий соотносятся как 1:3, т.е. их следует отнести к азотному и трем кольцевым протонам (рис. 4).

С ростом температуры в спектрах падает интенсивность самой сильнополюсной линии. При расплавлении эта линия из спектра исчезает, остаются только сигналы кольцевых и азотных протонов с соотношениями интенсивностей, соответствующими изолированным молекулам. Узкие сигналы спектров ПМР поликристаллического имидазола и пиразола и разделение их на три составляющие представлены на рис. 5.

Наличие водородных связей в исследуемых структурах, а также тот факт, что протоны водо-

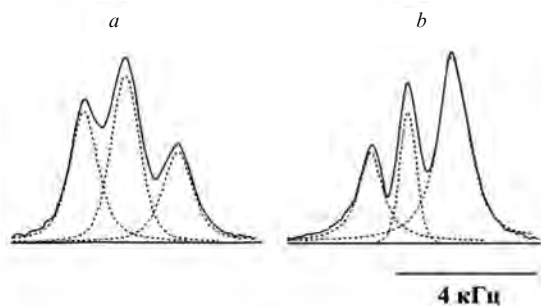
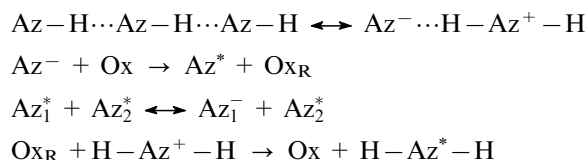


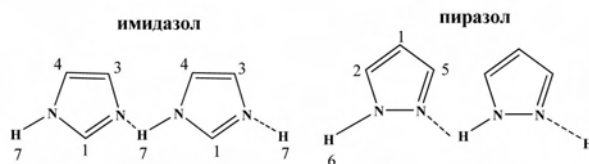
Рис. 5. Узкие сигналы спектров ПМР имидазола (а, 90 МГц) и пиразола (b, 200 МГц), эксперимент ( $T = 293 \text{ K}$ ) и разделение их на три составляющих.

родных связей совершают быстрые перескоки из одного положения равновесия в другое в двухъямном потенциале водородной связи, позволяет предположить, что к образованию свободных азольных радикалов ведут реакции протонно-электронного переноса и обмена [4]:



Зарождаться эти реакции могут на примесных центрах и дислокациях. Последние могут служить источником парамагнетизма, выступая в роли одноэлектронных окислителей.

Соотношение 1:2:2 интегральных интенсивностей линий в спектрах пиразола и 2:1:2 в спектрах имидазола позволяет предположить, что при комнатной температуре радикалы  $\text{H}-\text{Az}^*-\text{H}$  являются наиболее долгоживущими из всех частиц, имеющих радикальную природу.



Отнесение линий в триплетах можно провести следующим образом: центральная линия в спектре пиразола сформирована двумя кольцевыми протонами  $\text{H}_1$  и  $\text{H}_2$ . Наиболее сильнополюсная линия в спектре имидазола должна быть отнесена к протонам  $\text{H}_3$ ,  $\text{H}_4$ , а сигнал в слабом поле соответствует протону  $\text{H}_1$ . Изменение альтернации сигналов (смещение линии протона  $\text{H}_1$  далеко в слабое поле), связано, возможно, с наличием изотропных псевдоконтактных сдвигов в спектрах азолов. На это указывает величина расщепления узких компонент в спектрах поликристаллов (0.8–1 КГц), тогда как в спектрах растворов, где Н-связанные цепи гетероциклов заведомо отсутствуют, пики протонов кольца разделяют 114 Гц в имидазоле и 198 Гц в пиразоле. В спектре имидазола альтернация сигнала, по-видимому, отсутствует. В температурной эволюции узкой компоненты спектров как имидазола, так и пиразола с ростом температуры исчезает самая сильнополюсная

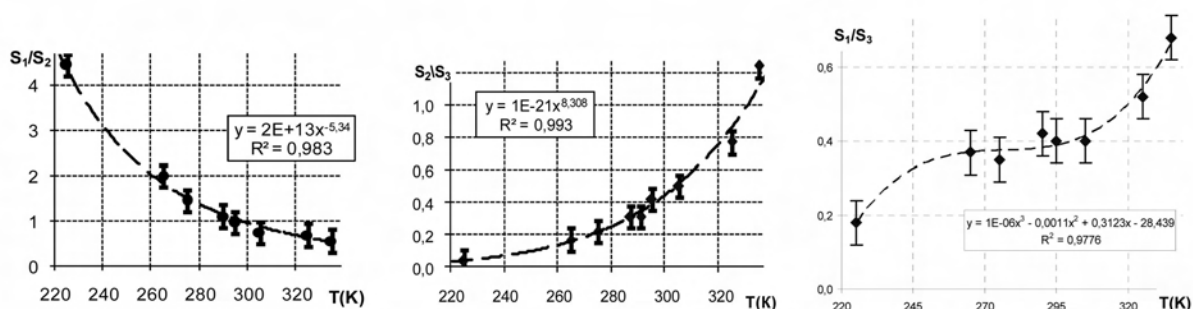
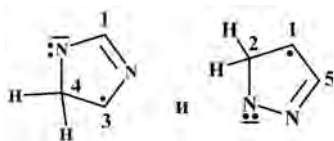


Рис. 6. Температурные зависимости соотношения интегральных интенсивностей линий  $S_i$  узкой компоненты спектров пиразола. Нумерация линий направлена в сильное поле.

линия триплета. В спектре расплава имидазола ( $T = 365$  К) наблюдаются лишь два пика с соотношением интегральных интенсивностей 1:3. С ростом температуры и разрывом водородных связей концентрация свободных радикалов типа  $\text{H}-\text{Az}^*-\text{H}$  в имидазоле падает, интенсивность формируемого ими спектра уменьшается.

Аналогичный процесс идет и в пиразоле, однако полностью сильнополюсная линия из спектра до расплавления образца исчезнуть не успевает. Зависимости, показанные на рис. 6, позволяют предположить, что при температуре  $T = 300$  К и ниже в азолах преобладают анион-радикалы типа  $\text{N}^{\cdot-}\text{N}$  ( $\text{Az}^*$ ), представленные в спектре наиболее сильнополюсной линией. Центральная линия синглета сформирована, по-видимому, кольцевыми протонами молекул, не связанных в водородные цепи. Сдвиг в сильное поле сигнала  $\text{Az}^*$ , возможно, определяется сверхтонким контактным взаимодействием. Не исключено также и наличие более экзотических типов азольных анион-радикалов.

Касаи [5] методом электронного парамагнитного резонанса показал, что при гелиевых температурах молекулы имидазола и пиразола имеют структуру анион-радикалов типа



Электронная спиновая плотность на атомах C(1) (пиразол) и C(3) (имидазол) весьма значительна ( $\sim +0.7$ ).

Известно, что в молекулярных кристаллах вследствие слабой интенсивности межмолекулярных взаимодействий (типа ван-дер-ваальсовых), электронные свойства молекул при образовании конденсированного состояния меняются весьма незначительно. Преобладание молекулярных свойств в кристалле приводит к выраженной локализации носителей заряда и экситонов на индивидуальных молекулах в кристалле. В результате молекулы кристаллических сопряженных гетероциклических соединений, в частности, ароматических углеводородов, содержат делокализованные  $\pi$ -электроны сопряжения и гетероатомы с неподеленной парой  $p$ -электронов. В таких органических кристаллах  $\pi$ -электроны и  $p$ -электроны являются потенциальными источниками свободных носителей заряда.

## Литература

1. В.О.Завельский, А.А.Лундин, Э.И.Федин. Доклады АН СССР. Сер. физ., **231** (5), 1153 (1976)
2. М.Гольдман. Спиновая температура и ЯМР в твердых телах, Мир, Москва, 1972. С. 110
3. V.Zavelsky, V.Babin, M.Vysokovskaya, E.Fedin. J. Phys. Org. Chem., **4**, 271–276 (1991)
4. A.N.Nesmeyanov, E.B.Zavelovich, V.N.Babin, N.S.Kochetkova, E.I.Fedin. Tetrahedron, **31**, 1462 (1975)
5. P.H.Kasai, Jr.McLeod. J. Am. Chem. Soc., **95**, 27 (1973)

# ИК-Спектрометрическое определение нитропростона — нового NO-донорного препарата на основе простагландина

И.В.Серков<sup>1</sup>, А.В.Ярков<sup>2</sup>, В.В.Безуглов<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Лаборатория специального органического синтеза ИФАВ РАН

<sup>2</sup> Лаборатория прикладной спектроскопии ИФАВ РАН

<sup>3</sup> Лаборатория оксилипинов ИБХ РАН

Одним из перспективных направлений создания гибридных мультитаргетных лекарственных препаратов является введение в молекулу известного лекарственного соединения фрагмента, являющегося генератором оксида азота (NO) [1]. NO — эндогенная сигнальная молекула, обладающая широким спектром биологической активности, играет важную роль во многих системах организма. NO-донорные препараты можно рассматривать как экзогенные источники NO, которые могут модифицировать свойства фармакофора.

Нитропростон (1',3'-динитроглицериновый эфир простагландина E<sub>2</sub>) представляет собой новое соединение на основе простагландина E<sub>2</sub> и является инновационным препаратом для лечения респираторных заболеваний, таких как астма и обструктивный бронхит. Его фармакологическая активность обеспечивается комбинированным многоцелевым действием на простаноидные рецепторы и растворимую гуанилилциклазу [2]. Нитропростон несет в себе структурный фрагмент простагландина E<sub>2</sub>, модифицированный дополнительным NO-донорным фрагментом 1,3-динитратомглицерина (рис. 1) и может

рассматриваться как нитрованное производное глицеринового эфира PGE<sub>2</sub> — природного метаболита COX-2 эндогенной молекулы (2-арахидоноилглицерина), относящейся к семейству эндоканнабиноидов [3].

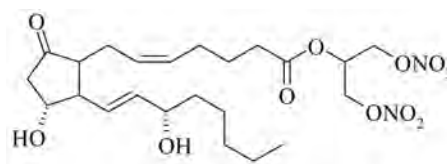


Рис. 1. Структурная формула нитропростона.

Присутствие NO-донорного фрагмента резко изменяет фармакологические свойства PGE<sub>2</sub>. Ранее нами было показано, что нитропростон способен расслаблять гладкие мышцы изолированной аорты крысы в отличие от естественного простагландина E<sub>2</sub>, который действует как сосудосуживающее средство. Более того, нитропростон является в 5 раз более активным гипотензивным средством, чем простагландин E<sub>2</sub> и более чем в 20 раз увеличивает расслабление дыхательных мышц [3].

Цель настоящего исследования — разработка метода определения подлинности субстанции и лекарственной формы, содержащей нитропростон. Для этого необходимо выделить в ИК-спектре характерные сигналы функциональных групп нитропростона и определить предел детектирования этого вещества с помощью ИК-спектрометрии.

Для определения подлинности субстанции использованы интенсивные полосы (рис. 2): 1743 см<sup>-1</sup> (CO), 1652 см<sup>-1</sup> (ONO<sub>2</sub> асимм) и

**И.В.Серков.** Доктор химических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории специального органического синтеза ИФАВ РАН.

e-mail: serkoviv@mail.ru

**А.В.Ярков.** Кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории прикладной спектроскопии ИФАВ РАН.

e-mail: yarkov@ipac.ac.ru

**В.В.Безуглов.** Доктор химических наук, главный научный сотрудник лаборатории оксилипинов ИБХ РАН.

e-mail: vvbez@mx.ibch.ru

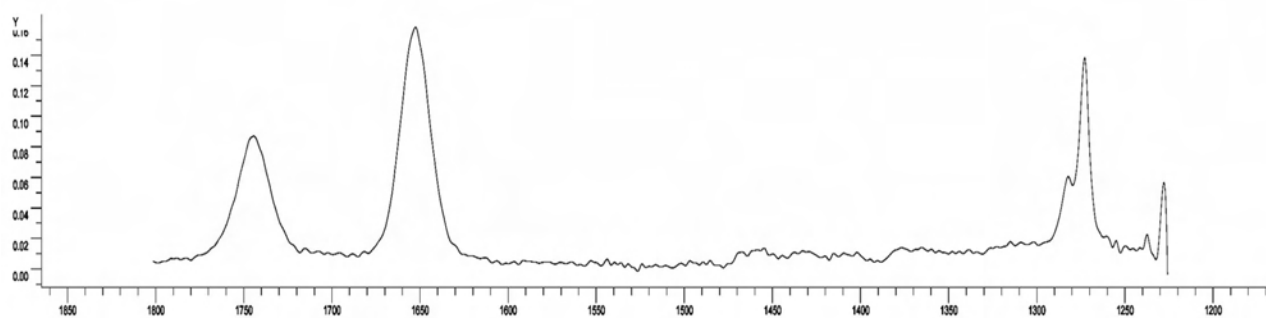


Рис. 2. ИК-спектр нитропропрона в области колебаний нитрато- и карбонильной групп.

$1274\text{ см}^{-1}$  ( $\text{ONO}_2$  симм). Эти же сигналы можно использовать для количественного определения нитропропрона в лекарственной форме.

Для определения экстинкции нитропропрона навеску в 2 мг растворяли в 1 мл хлороформа. Далее из этого стандартного раствора были приготовлены образцы с концентрацией  $3.88 \cdot 10^{-3}$  М,  $1.94 \cdot 10^{-3}$  М,  $7.76 \cdot 10^{-4}$  М,  $1.94 \cdot 10^{-4}$  М и  $7.76 \cdot 10^{-5}$  М. Спектры регистрировали на ИК-интерферометре Bruker IFS 113v с разрешением  $2\text{ см}^{-1}$  в кювете из  $\text{CaF}_2$  толщиной 1.014 мм. Измеряли пиковые интенсивности указанных выше полос. Экстинкцию вычисляли по линейному уравнению Бугера – Ламберта-Бера:

$$A = E \cdot C \cdot L$$

$A$  — абсорбция,  $E$  — экстинкция,  $\text{М}^{-1} \cdot \text{мм}^{-1}$ ,  
 $C$  — концентрация, М;  $L$  — толщина кюветы, мм.

Полученные значения экстинкции полос составляли:  $130 \pm 10$  для полосы  $1743\text{ см}^{-1}$ ,  $215 \pm 15$  для полосы  $1652\text{ см}^{-1}$  и  $177 \pm 10$  для полосы  $1274\text{ см}^{-1}$ . Наиболее интенсивной оказалась полоса асимметричных колебаний нитратной группы ( $1652\text{ см}^{-1}$ ). Предел чувстви-

тельности метода составил не менее  $7.76 \cdot 10^{-5}$  М нитропропрона (рис. 3).

Лекарственная форма препарата на основе нитропропрона содержит вспомогательные вещества — Полисорбат-80, хлорид бензалкония и хлорид натрия, что усложняет определение количества активного вещества. На основе построенных калибровок поглощение – концентрация было проведено тестовое количественное определение нитропропрона в образце лекарственной формы. Исследования показали, что только полоса  $1652\text{ см}^{-1}$  может быть использована для количественного определения нитропропрона в реальном препарате вследствие интенсивного поглощения в области  $1745\text{ см}^{-1}$  и  $1220\text{--}1300\text{ см}^{-1}$  Полисорбата-80. Содержание нитропропрона в лекарственной форме составляет  $10\text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$ . Поэтому до анализа необходимо провести экстракцию действующего вещества. После пробоподготовки остаток из 1 мл лекарственной формы растворяли в 200 мкл хлороформа и регистрировали ИК-спектр в кювете из  $\text{CaF}_2$ . В спектре надежно идентифицирована полоса  $1652\text{ см}^{-1}$ , что подтверждает

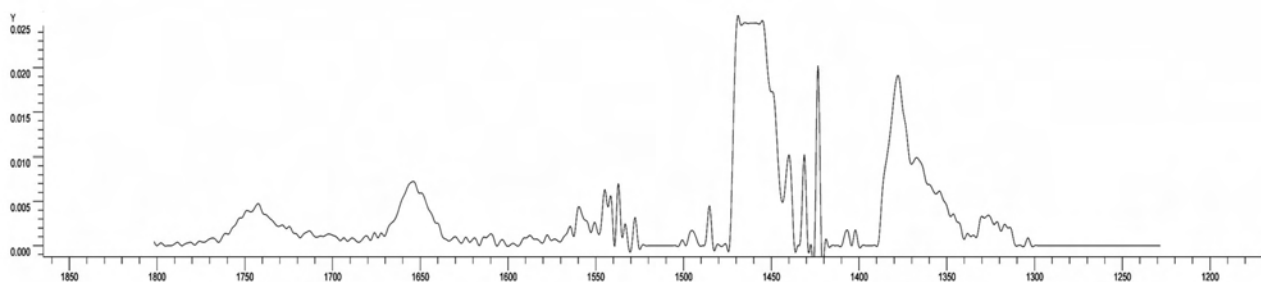


Рис. 3. ИК-спектр нитропропрона при концентрации  $7.76 \cdot 10^{-5}$  М.

наличие нитропростона в лекарственной форме. С использованием значения экстинции определено содержание действующего вещества в пробе, которое составило 6.5–7 мкг. С учетом потерь при экстракции (~30%, что определено независимым методом количественного анализа) это соответствует исходному количеству субстанции.

Таким образом, разработан метод определения подлинности лекарственного средства Нитропростон.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (Государственный контракт № 14.N08.12.1032).

### Литература

1. И.В.Серков, В.В.Безуглов. *Успехи химии*, **78**, 442 (2009)
2. В.В.Безуглов, И.В.Серков. «*Бронхолитическое средство на основе простагландина*». Патент РФ № 2500397 (2012)
3. И.В.Серков, В.В.Безуглов. *Биоорганическая химия*, **35** (2), 252–254 (2009)

# [18-π] + [14-π] Макроциклические системы состава фталоцианин – субфталоцианин как потенциальные материалы для нелинейной оптики

А.Ю.Толбин,<sup>1</sup> В.Е.Пушкарев,<sup>1</sup> Л.Г.Томилова<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Лаборатория фталоцианинов и их аналогов ИФАВ РАН

<sup>2</sup> МГУ им. М.В.Ломоносова, Химический факультет

Во второй половине XX века было обнаружено, что циклизация фталодинитрила в присутствии галогенидов бора не приводит к образованию фталоцианина, как это имеет место быть в случае солей металлов. При этом из реакционной смеси был выделен окрашенный продукт, явно отличающийся по химическим и спектральным свойствам от фталоцианинов [1]. Рентгеноструктурный анализ показал, что этот продукт имеет выпуклую структуру, которая относится к группе симметрии  $C_3$  и состоит из трех фрагментов изоиндола. Данное соединение, имеющее ярко-пурпурную окраску, первооткрыватели Меллер и Оско назвали субфталоцианином (рис. 1) [2].

С момента своего открытия субфталоцианины стали привлекать внимание исследователей благодаря своим уникальным оптическим свойствам, обусловленным 14-π-электронной системой сопряжения. Интенсивное поглощение в видимой области ( $\epsilon \sim 90\,000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), термическая и лучевая стойкость, способность к межмолекулярному переносу заряда открывает для субфталоцианинов такие области применения, как нелинейная оптика, микро- и наноэлектроника [3–8].

Высокая подвижность аксиального галогенида в субфталоцианинах позволяет осуществлять структурное модифицирование и получать наноразмерные макроциклические производные. В лаборатории фталоцианинов и их аналогов ИФАВ РАН разработаны высокоэффективные методы получения субфталоцианинов (14-π) и ковалентных ансамблей с фталоцианинами (18-π) на их основе, названные нами макроциклическими системами [18-π] + [14-π].

Первично потребовалась оптимизация традиционного метода синтеза субфталоцианинов, состоящего в тримеризации фталогиенов в присутствии галогенидов бора в нафталине или α-хлорнафталине при температуре около 200°C [9].

Отмечено, что в ходе циклизации молекула  $\text{BCl}_3$  поляризуется, что приводит к формированию промежуточного продукта  $\text{SubPcBCl}-\text{Cl}_2$  с искаженной геометрией. Высокое напряжение структуры интермедиата является причиной ее разрушения (схема 1). При этом выделяется молекулярный хлор, который должен связываться растворителем в присутствии кислоты Льюиса ( $\text{BCl}_3$ ). Однако происходит молекуляр-

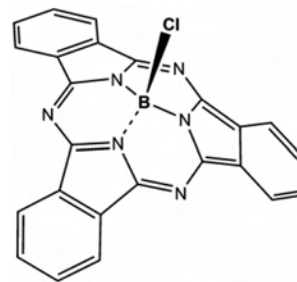


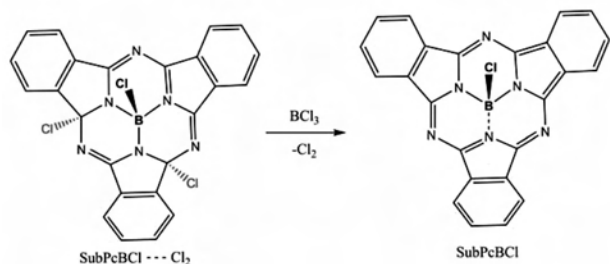
Рис. 1. Структурная формула незамещенного субфталоцианина.

**А.Ю.Толбин.** Доктор химических наук, профессор РАН, ведущий научный сотрудник лаборатории фталоцианинов и их аналогов ИФАВ РАН. e-mail: tolbin@ipac.ac.ru

**В.Е.Пушкарев.** Доктор химических наук, главный научный сотрудник, заведующий лабораторией фталоцианинов и их аналогов ИФАВ РАН. e-mail: pushkarev@ipac.ac.ru

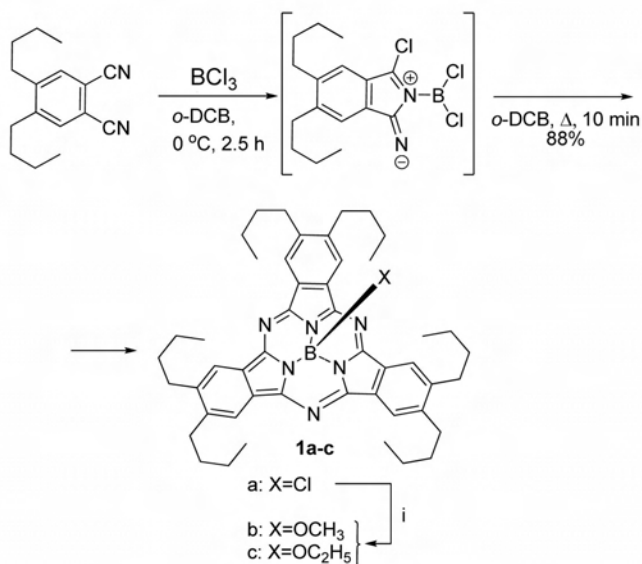
**Л.Г.Томилова.** Доктор химических наук, главный научный сотрудник лаборатории фталоцианинов и их аналогов ИФАВ РАН, профессор Химического факультета МГУ им. М.В.Ломоносова. e-mail: tom@org.chem.msu.ru

Схема 1. Заключительная стадия формирования субфталоцианина.



ное хлорирование не только растворителя, но и самого целевого продукта, что является причиной понижения выхода вследствие протекания побочных деструктивных процессов, а высокая температура этому только способствует. Наши исследования подтверждают предполагаемый механизм. Действительно, использование различных высококипящих растворителей, таких как *o*-дихлорбензол (*o*-DCB), 1,2,4-трихлорбензол, *o*-ксилол и др., при избытке реагента в течение длительного времени практически не приводит к получению целевых субфталоцианиновых продуктов. Из реакционных смесей нами были выделены темно-коричневые порошки, представляющие собой, по данным масс-спектрометрии, полихлорпроизводные субфталоцианинов. Отсюда следует необходимость использования стехиометрического соотношения реагентов и большого разбавления. Оптимизиро-

Схема 2. Оптимизированный метод получения субфталоцианинов. Замещение аксиального галогенида (i): MeOH или EtOH в ТГФ/Ру.



ванный метод получения субфталоцианинов представлен нами в работе [10] (схема 2).

Важным обстоятельством явился тот факт, что первоначально  $\text{BCl}_3$  должен вступить в реакцию с фталодинитрилом. Это происходит при пониженной температуре (от  $0$  до  $+5^\circ\text{C}$ ) в течение довольно продолжительного времени (1–3 ч). Формирование субфталоцианинового макроцикла начинается, когда реакционная смесь окрашивается в оранжевый цвет, при этом в электронном спектре поглощения (ЭСП) начинает появляться полоса при  $575$  нм, отвечающая целевому соединению **1a** (соответствующий ЭСП представлен далее на рис. 3). Нагревание ускоряет процесс циклизации, а предварительная отгонка избытка реагента впоследствии дает полное отсутствие побочных хлорпроизводных. Вероятно, при этом молекулярный хлор просто покидает реакционную смесь, не вступая в реакцию ни с растворителем, ни с макроциклическими соединениями. Субфталоцианин **1a** был получен с выходом 88%. Побочные продукты в данном методе — смолы, образующиеся при полимерации фталонитрила. Дальнейшая оптимизация метода путем замены *o*-DCB на толуол позволила достичь практически количественных выходов субфталоцианинов.

Аксиальный галогенид в субфталоцианине **1a** обладает высокой подвижностью, что позволяет модифицировать его структуру в мягких условиях. Соответствующие алкокси-производные **1b,c** были получены практически с количественными выходами. В масс-спектрах (метод MALDI-TOF без матрицы) субфталоцианинов **1a-c** обнаружены пики молекулярных  $[\text{M} - \text{H}]^+$  и осколочных ионов:  $[\text{M} - \text{Cl}]^+$  для **1a**,  $[\text{M} - \text{OR}]^+$  для **1b,c** (табл. 1). Интересно отметить, что при использовании 2,5-дигидроксibenзойной кислоты (DHB) в качестве матрицы в MALDI-TOF масс-спектре соединения **1a** вместо пика молекулярного иона обнаруживается пик с  $m/z$  884, который соответствует продукту аксиального замещения хлора на анион DHB.

Образование такого иона в ходе масс-спектрометрической реакции также подтверждает высокую подвижность аксиального галогена. В случае комплексов **1b,c** (с аксиальным заместителем OR) подобных ионов зафиксировано не было.

**Таблица 1.** Масс-спектрометрия субфталоцианинов **1a–c** (метод MALDI-TOF).

Соединение	Брутто-формула	$M_w$ (средняя)	Пики ионов, наблюдаемые в спектре
<b>1a</b>	$C_{48}H_{60}BClN_6$	767.29	766 $[M-H]^+$ , 731 $[M-Cl]^+$
<b>1b</b>	$C_{49}H_{63}BN_6O$	762.88	762 $[M-H]^+$ , 747 $[M-CH_3]^+$ , 731 $[M-OCH_3]^+$
<b>1c</b>	$C_{50}H_{65}BN_6O$	776.90	776 $[M-H]^+$ , 731 $[M-OC_2H_5]^+$

При взаимодействии субфталоцианина **1a** с несимметрично замещенными монофталоцианинами, содержащими в структуре свободную OH-группу, были получены диады —  $\mu$ -оксокомплексы, представляющие собой сочетание двух различных  $\pi$ -систем в одной молекуле (рис. 2).

Нами было показано, что добавление оснований (для удаления протона с OH-группы фталоцианинов) или проведение реакции в высококипящих спиртах ведет к деструкции субфталоцианиновой субъединицы. Причиной является раскрытие субфталоцианина с дальнейшей полимеризацией открытого тримера. Это свойство субфталоцианинов нашло применение при получении несимметрично замещенных фталоцианинов, когда раскрытие макроцикла проводят в нуклеофильных средах в присутствии какого-либо фталогена [11].

Следовательно, нужно использовать неполярные высококипящие растворители, напри-

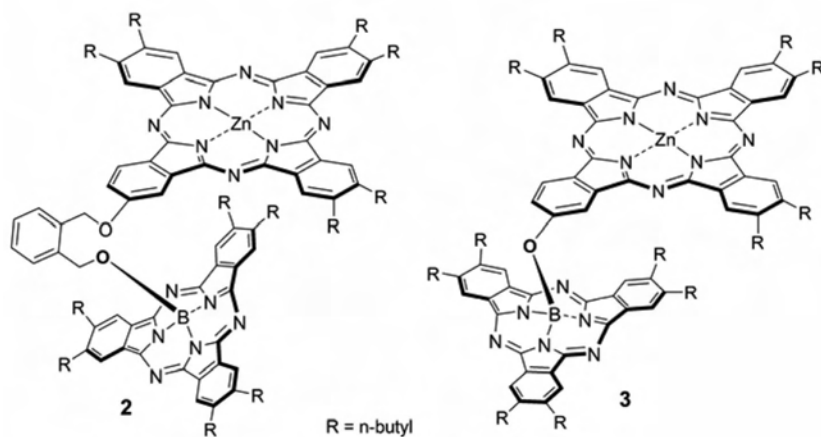
мер, толуол или *o*-ксилол. При этом HCl свободно покидает реакционную смесь, что подтверждается при помощи лакмусового индикатора.

Диады  $[18-\pi] + [14-\pi]$  (соединения **2, 3**) образуются с выходами, близкими к количественным. При этом наблюдается различие во времени протекания обеих реакций, что может быть связано с различной степенью взаимного экранирования макроциклов. В масс-спектрах MALDI-TOF гетеролигандных комплексов **2,3** найдены пики молекулярных  $[M-H]^+$  и характеристических осколочных ионов, образованных разрывом простых эфирных связей (табл. 2).

Характер ЭСП гетеролигандных комплексов **2,3** свидетельствует о наличии в сложных молекулах как фталоцианиновой, так и субфталоцианиновой составляющих (рис. 3).

Обнаружено, что интенсивность субфталоцианиновой полосы поглощения в комплексах **2, 3** почти в три раза меньше, по сравнению с **1a** (при той же концентрации), при этом наблюдается ее гипсохромное смещение на 2–3 нм. Фталоцианиновая полоса также смещается на 2–3 нм по сравнению с соответствующими монофталоцианинами, но батохромно. Наблюдается также батохромное смещение субфталоцианиновой полосы в **2, 3** на 2–4 нм по сравнению с **1a–c**. Эти факты свидетельствуют о специфической взаимной ориентации обоих макроциклов, отличной от таковой для механической смеси исходных компонентов.

Представленные диады  $[18-\pi] + [14-\pi]$  устойчи-



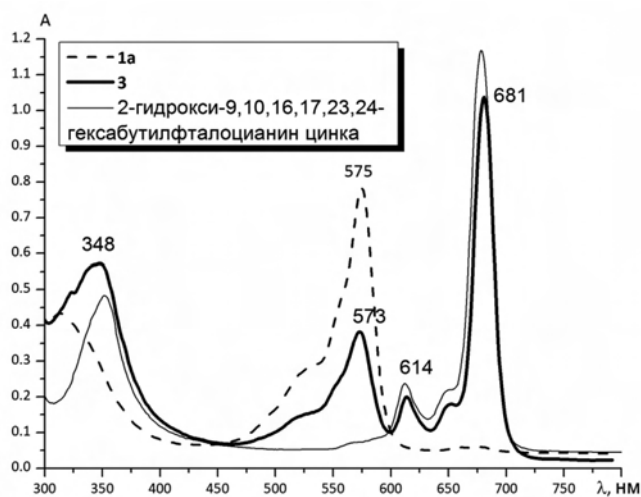
**Рис. 2.** Структуры гетеролигандных диад  $[18-\pi] + [14-\pi]$  — продуктов взаимодействия субфталоцианина **1a** с несимметрично замещенными монофталоцианинами: толуол, кипячение 15–20 ч.

вы в большинстве органических растворителей. В присутствии даже таких слабых кислот, как  $AsOH$ , связь  $B-O$  в данных комплексах расщепляется практически мгновенно при комнатной температуре, давая исходные компоненты. При этом выделяется субфталоцианин бора, содержащий OH-группу в аксиальном положении, что было показано при помощи масс-спектрометрии. Такая же деструкция протекает практически нацело и на силикагеле или окиси алюминия, в связи с чем, очистка целевых гетеролигандных комплексов **2, 3**



**Таблица 2.** Масс-спектрометрия комплексов **2**, **3** (метод MALDI-TOF).

Соединение	Брутто-формула	$M_w$ (средняя)	Пики ионов, наблюдаемые в спектре
<b>2</b>	$C_{112}H_{131}BN_{14}O_2Zn$	1781.55	1780 $[M-H]^+$ , 927 $[M-C_{56}H_{68}BN_6O]^+$ , 851 $[M-C_{56}H_{63}N_8OZn]^+$
<b>3</b>	$C_{104}H_{123}BN_{14}OZn$	1661.40	1659 $[M-H]^+$ , 731 $[M-C_{56}H_{63}N_8OZn]^+$

**Рис. 3.** ЭСП гетеролигандного комплекса **3** в сравнении со спектрами исходного субфталоцианина **1a** и 2-гидрокси-9,10,16,17,23,24-гексабутилфталоцианина цинка (THF).

нами была проведена с использованием гель-проникающей хроматографии на шитом полимере марки «BioBeads SX-1».

Согласно данным квантово-химических расчетов (метод DFT), фталоцианиновый и субфталоцианиновый макроциклы развернуты относительно друг друга, благодаря специфической геометрии спейсеров (рис. 4).

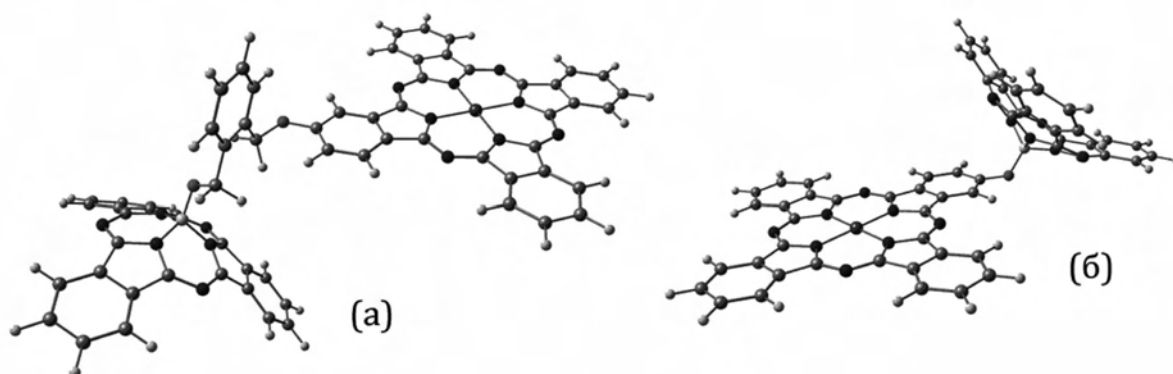
Это практически исключает возможность внутримолекулярного взаимодействия их  $\pi$ -сис-

тем. Как следствие, в ЭСП (см. рис. 3) наблюдаются  $Q$ -полосы обеих компонент, схожие по положению и форме с исходными соединениями. Также из-за нарушения тра-

диционного межмолекулярного стэкингового взаимодействия, гетеролигандные диады  $[18-\pi] + [14-\pi]$ , в отличие от исходных соединений, превосходно растворяются в целом ряде органических растворителей — от петролейного эфира до спиртов, DMF и DMSO.

Высокая асимметрия структур является причиной высоких дипольных моментов ( $\mu_D$ ) соединений **2**, **3**. По сравнению с несимметрично замещенными фталоцианинами, у гетеролигандных диад можно ожидать увеличения  $\mu_D$  в 2–2.5 раза. На фоне же субфталоцианиновой компоненты увеличение  $\mu_D$  может быть не столь заметным. Высокие дипольные моменты играют важнейшую роль в нелинейной оптике, т.к. приводят к поляризации всей молекулы под действием внешних полей. Для фотофизических приложений полезной окажется способность таких диад к внутримолекулярному переносу заряда. Не исключено, что диады  $[18-\pi] + [14-\pi]$  обладают способностью и к наноагрегации. В настоящее время нами проводятся исследования спектральных, оптических и фотофизических свойств гетеролигандных комплексов на основе субфталоцианинового и фталоцианинового макроциклов.

Данное научное направление финансируется Российским научным Фондом (грант № 17-13-01197). Авторы выражают благодарность Меж-

**Рис. 4.** Оптимизированные структуры гетеролигандных комплексов **2** (а) и **3** (б).

ведомственному суперкомпьютерному центру РАН за предоставляемые вычислительные ресурсы ([www.jscc.ru](http://www.jscc.ru)). Работа выполнена в рамках Государственного задания 2018 года (тема № 45.5 «Создание соединений с заданными физико-химическими свойствами»).

### Литература

1. J.Rauschnabel, M.Hanack. *Tetrahedron Lett.*, **36**, 1629–1632 (1995)
2. A.Meller, A.Ossko. *Monatsh. Chem.*, **103**, 150–155 (1972)
3. A.Sastre, T.Torres, M.A.Diaz-Garcia, F.Agullj-Lopez, C.Dhenaut, S.Brassellet, I.Ledoux, J.Zyss. *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 2746–2747 (1996)
4. C.G.Claessens, D.Gonzalez-Rodriguez, T.Torres, G.Martin, F.Agullo-Lopez, I.Ledoux, J.Zyss, V.R.Ferro, J.M.Garcia de la Vega. *J. Phys. Chem. B*, **109**, 3800–3806 (2005)
5. D.Gonzalez-Rodriguez, C.G.Claessens, T.Torres, S.Liu, L.Echegoyen, N.Vila, S.Nonell. *Chem. Eur. J.*, **11**, 3881–3893 (2005)
6. D.Gonzalez-Rodriguez, T.Torres, M.M.Olmstead, J.Rivera, M.A.Herranz, L.Echegoyen, C.Atienza-Castellanos, D.M.Guldi. *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 10680–10681 (2006)
7. D.D.Diaz, H.J.Bolink, L.Cappelli, C.G.Claessens, E.Coronado, T.Torres. *Tetrahedron Lett.*, **48**, 4657–4660 (2007)
8. M.S.Rodriguez-Morgade, C.G.Claessens, A.Medina, D.Gonzalez-Rodriguez, E.Gutierrez-Puebla, A.Monge, I.Alkorta, J.Elguero, T.Torres. *Chem. Eur. J.*, **14**, 1342–1350 (2008)
9. R.S.Nohr, C.V.McCallum, H.-P.Schuchmann. *J. Porphyrins Phthalocyanines*, **14**, 271–277 (2010)
10. A.Yu.Tolbin, M.O.Breusova, V.E.Pushkarev, L.G.Tomilova. *Russian Chemical Bulletin*, **54**, 2083–2086 (2005)
11. A.Yu.Tolbin, L.G.Tomilova. *Russian Chemical Reviews*, **80**, 531 (2011)

# Новые аналоги фталоцианинов — перспективные составляющие полупроводниковых материалов

Т.В.Дубинина,<sup>1,2</sup> А.Д.Косов,<sup>2</sup> М.М.Осипова,<sup>2</sup> С.С.Маклаков,<sup>3</sup>  
Е.Ф.Петрусевиц,<sup>2</sup> В.Е.Пушкарев,<sup>1,2</sup> Л.Г.Томилова<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Институт физиологически активных веществ Российской академии наук

<sup>2</sup> МГУ им. М.В.Ломоносова, Химический факультет

<sup>3</sup> Институт теоретической и прикладной электродинамики РАН

Разработка методов синтеза и выявление взаимосвязи между структурой, оптическими и полупроводниковыми свойствами новых аналогов фталоцианинов является важной задачей. Наибольший интерес для микроэлектроники и фотогальванических элементов представляют два типа фталоцианиновых аналогов: субфталоцианины и бис(фталоцианинаты) лантанидов (III) сэндвичевого строения.

Субфталоцианины благодаря 14-π электронной системе сопряжения, формируемой вокруг центрального иона бора, обладают интенсивным поглощением и флуоресценцией в видимой области спектра (500–600 нм) [1, 2]. Кроме того, они обладают уникальными нелинейно-оптическими

свойствами [3–5]. Путем формирования на их основе композиционных материалов с полимерами возможно создание фотогальванических элементов с объемным гетеропереходом. Таким образом, важной задачей является синтез новых замещенных субфталоцианинов и их аналогов, обладающих различными по природе периферическими и аксиальными заместителями.

Для дифталоцианиновых комплексов сэндвичевого типа, существующих в виде стабильных π-радикалов с делокализацией неспаренного электрона между двумя макрокольцами, характерно проявление выраженных полупроводниковых свойств. Важно отметить, что структурная модификация данных комплексов возможна в трех направлениях: по макроциклу, периферийным заместителям и центральному иону лантанида.

Нами разработан эффективный (выходы до 75%) одностадийный подход к синтезу не описанных ранее фенил- и феноксизамещенных субфталоцианинов **2** на основе соответствующих *o*-фталодинитрилов **1** (схема 1) [6]. Стоит отметить, что в литературных источниках для синтеза арилзамещенных субфталоцианинов ранее описан двухстадийный подход [7], предполагающий получение иодзамещенного субфталоцианина, который затем вводился в реакции кросс-сочетания, при этом суммарный выход целевого комплекса составлял около 30%. Таким образом, разработанная нами методика является более простой и эффективной. Целевые соединения охарактеризованы методами спектроскопии ЯМР <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>11</sup>B и <sup>1</sup>H–<sup>1</sup>H NOESY, а также масс-спектрометрии MALDI TOF/TOF высокого разрешения.

**Т.В.Дубинина.** Кандидат химических наук, научный сотрудник лаборатории фталоцианинов и их аналогов ИФАВ РАН, научный сотрудник Химического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова.

e-mail: dubinina.t.vid@gmail.com

**А.Д.Косов.** Младший научный сотрудник Химического факультета МГУ им. М.В.Ломоносова.

e-mail: snowjedi@mail.ru

**М.М.Осипова.** Инженер Химического факультета МГУ им. М.В.Ломоносова. e-mail: omm517@mail.ru

**С.С.Маклаков.** Кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник Института теоретической и прикладной электродинамики РАН.

e-mail: squirrel498@gmail.com

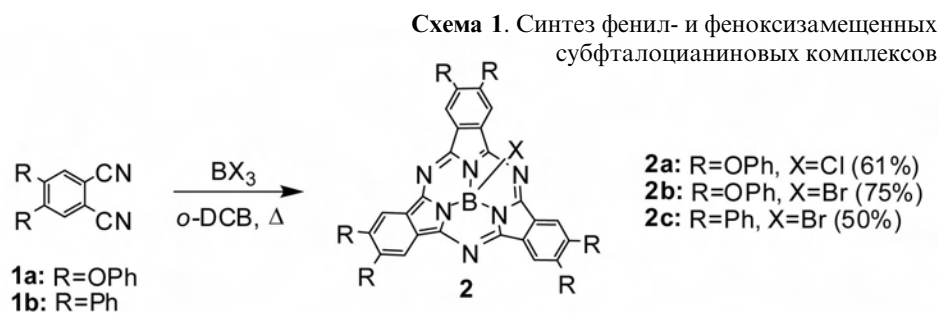
**Е.Ф.Петрусевиц.** Студент Химического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова. e-mail: petrusevich.l@gmail.com

**В.Е.Пушкарев.** Доктор химических наук, главный научный сотрудник, заведующий лабораторией фталоцианинов и их аналогов ИФАВ РАН.

e-mail: pushkarev@ipac.ac.ru

**Л.Г.Томилова.** Доктор химических наук, главный научный сотрудник лаборатории фталоцианинов и их аналогов ИФАВ РАН, профессор Химического факультета МГУ им. М.В.Ломоносова.

e-mail: tom@org.chem.msu.ru



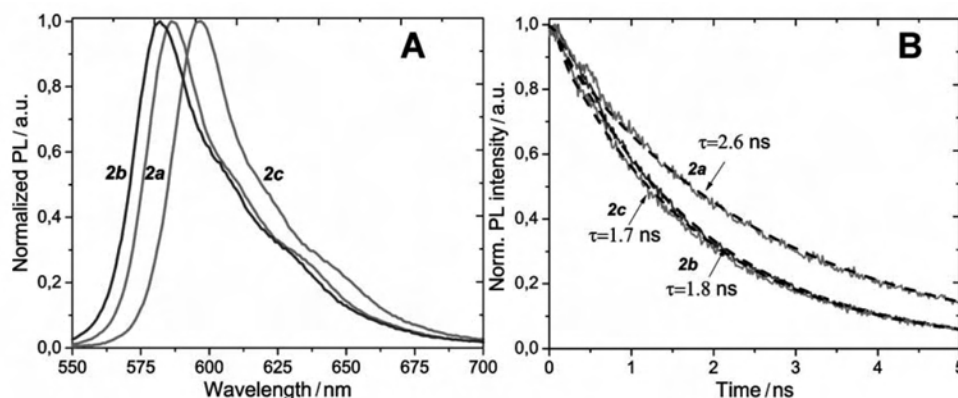
С использованием методов флуоресцентной спектроскопии и электронной спектроскопии поглощения показано, что положение основных максимумов люминесценции и поглощения комплексов **2** практически не зависит от природы аксиального галогенид-иона. Литературные данные для фталоцианиновых комплексов указывают на то, что фенокси-заместители могут обладать как электронодонорными, так и электроноакцепторными свойствами [8]. На примере комплексов **2** мы впервые провели исследование эффектов арильных заместителей для субфталоцианинов [6]. Обнаружено, что при переходе от фенокси-заместителей к фенильным заместителям наблюдается батохромное смещение полос люминесценции и поглощения субфталоцианинов **2**, что свидетельствует об усилении электронодонорного эффекта для соединения **2c** по сравнению с соединениями **2a,b**. Электрохимические свойства полученных субфталоцианиновых комплексов, исследованные методом циклической вольтамперометрии, подтверждают усиление электронодонорных свойств фенильных групп по сравнению с фенокси-группами. Об этом свидетельствует увеличение потенциалов

восстановления и уменьшение потенциалов окисления для фенилзамещенного субфталоцианина (**2c**) по сравнению с феноксизамещенными (**2a,b**).

С применением совокупности методов электронной спектроскопии поглощения, стационарной и время-разрешенной флуориметрии (рис. 1), а также Z-сканирования определены сечения поглощения, квантовые выходы флуоресценции и интеркомбинационной конверсии, времена жизни возбужденных состояний и нелинейно-оптические свойства субфталоцианиновых комплексов.

Определена корреляция между сечением поглощения в основном и первом возбужденном синглетном состояниях. Показано, что замена аксиального иона хлора на бром приводит к уменьшению сечения поглощения первого возбужденного синглетного состояния. Однако при переходе от феноксизамещенного субфталоцианина к фенилзамещенному данная величина увеличивается. Эта необычная закономерность выявлена нами впервые.

Впервые зарегистрированы пикосекундные времена жизни высоколежащих возбужденных состояний субфталоцианинов. Важно отметить, что все синтезированные комплексы демонстрируют высокие выходы интеркомбинационной конверсии (80–90%), что свидетельствует о возможности эффективного образования синглетного кислорода.



**Рис. 1.** Нормированные спектры люминесценции соединений **2a**–**c** (A). Кривые кинетики люминесценции исследуемых образцов (B) [6].

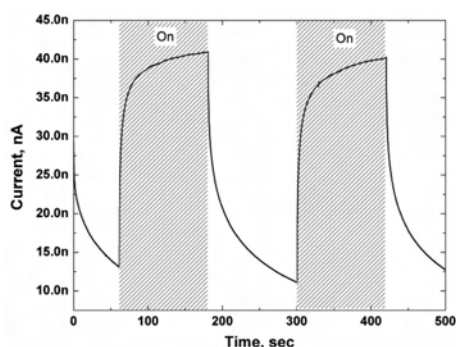


Рис. 2. Время-разрешенный отклик композиционного материала  $\text{PhOSubPc}(2a) : \text{MEN-PPV}$  (2 : 1) [9].

На основе феноксизамещенного субфталочиаина **2a** и поли[2-метокси-5-(2-этилгексил-окси)-1,4-фениленвинилена] (МЕН-PPV) получен органический фоторезистивный материал — потенциальный датчик дневного света (рис. 2) [9].

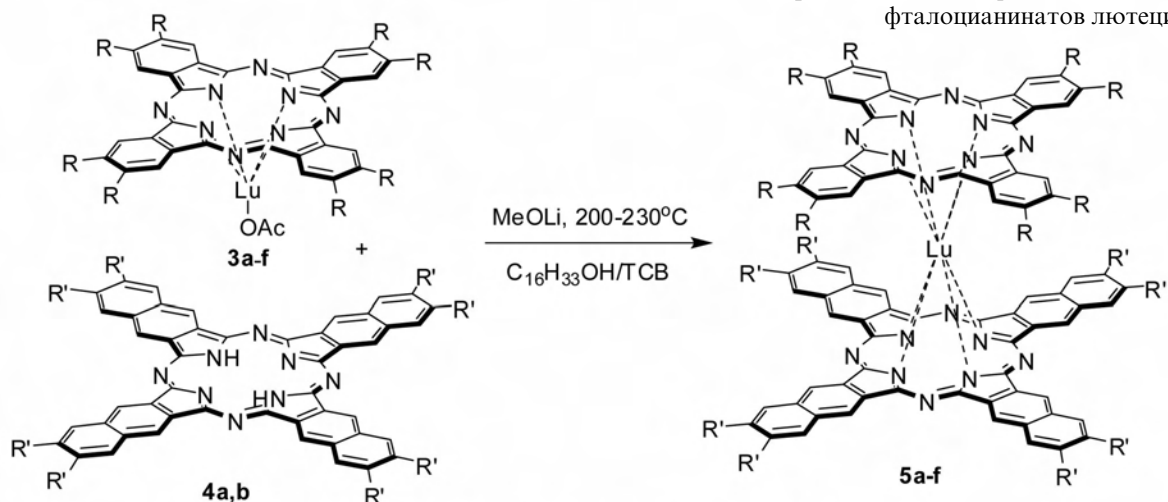
Показано влияние состава и морфологии на свойства полученного материала. Фотоэлектрохимические характеристики материала определены с использованием импедансной спектроскопии и конфокальной флуоресцентной микроскопии.

В зависимости от соотношения субфталочиаин – полимер значения сопротивления изменяются в интервале:  $10^7 - 10^9 \text{ Ом} \cdot \text{см}$ , а фоторезистивный эффект ( $R_0/R$ ) изменяется от 1.7 до 12.5. При этом наилучшие результаты (сопротивление  $10^7 \text{ Ом} \cdot \text{см}$ , фоторезистивный эффект равен 1.7) получены для соотношения 1:1. Кроме того, при увеличении степени неоднород-

ности пленки сопротивление возрастает в несколько раз.

Одними из наиболее интересных представителей двухпалубных комплексов сэндвичевого строения являются гетеролептические комплексы, объединяющие в себе свойства составляющих их макроколец. Нами был разработан селективный подход к получению, а также исследованы электрофизические и оптические характеристики гетеролептических нафталочианинофталочианинов лютеция.<sup>10</sup> Разработанная методика синтеза на основе готовых блоков (однопалубных комплексов **3a–f** и нафталочианиновых лигандов **4a,b** (схема 2)) позволила получить серию не описанных ранее гетеролептических двухпалубных производных **5a–f**, содержащих во фталочианиновом макрокольце как донорные (фенил-, фенокси-), так и акцепторные (хлор) заместители.

Благодаря наличию  $\pi$ -радикала, подтвержденному данными ЭПР, в электронных спектрах поглощения (ЭСП) гетеролептических комплексов **5** в ближней ИК-области наблюдаются *IV* полосы поглощения. Важно отметить, что *Q* и *RV* полосы гетеролептического комплекса занимают промежуточное положение между соответствующими полосами поглощения гомолептических дифталочиаина и динафталочиаина. Это указывает на равную долю вклада в молекулярные орбитали гетеролептического комплекса фталочианиновой и нафталочианиновой составляющей.



**5a:** R = H, R' = Ph (60%); **5b:** R = Cl, R' = Ph (54%); **5c:** R = Ph, R' = Ph (52%);  
**5d:** R = H, R' = OPh (61%); **5e:** R = Cl, R' = OPh (60%); **5f:** R = OPh, R' = OPh (62%)

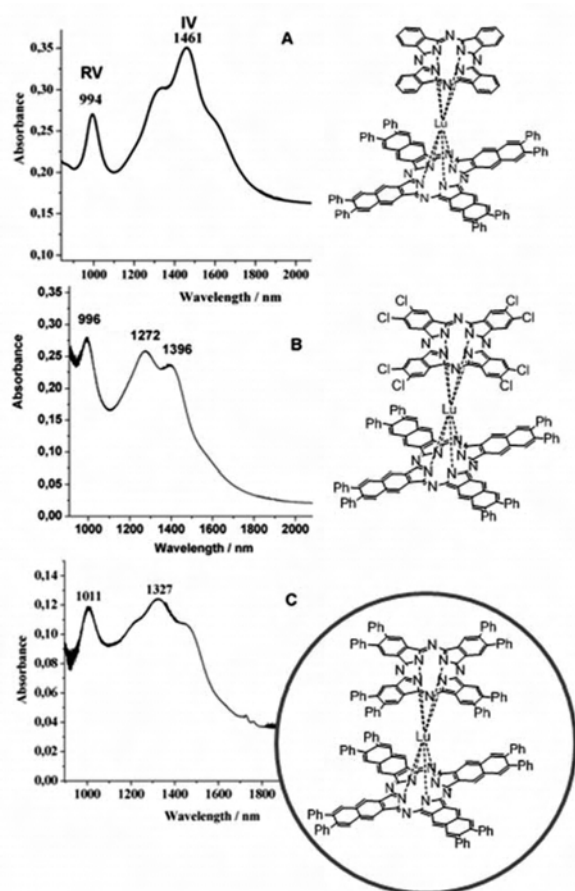


Рис. 3. Спектры поглощения в ближней ИК-области для растворов гетеролептических комплексов **5** в  $\text{CCl}_4$ .

Путем оригинального комбинирования данных ЭСП в ближней ИК-области и оптической микроскопии показано, что введение фенильных групп в качестве заместителей приводит к усилению внутримолекулярных  $\pi$ – $\pi$ -взаимодействий как в растворах, так и в тонких пленках гетеролептических комплексов. Усиление внутримолекулярных  $\pi$ – $\pi$ -взаимодействий также хорошо согласуется с гипсохромным сдвигом *IV* полосы для гексадекафенилзамещенного сэндвича **5c** в сравнении с октафенилзамещенными аналогами (рис. 3).

Усиление  $\pi$ – $\pi$ -взаимодействий приводит к снижению энергии активации и улучшению полупроводниковых характеристик (уменьшение удельного сопротивления и увеличение проводимости) гексадекафенилзамещенного комплекса **5c** по сравнению с октафенилзамещенными комплексами **5a** и **5b**. В литературных данных ранее отсутствовали сведения о влиянии периферийных заместителей на полупроводниковые свойства гетеролептических комплексов лантанидов.

Таким образом, нами разработаны эффективные методы синтеза неописанных ранее субфталоцианинов и гетеролептических нафталоцианинато-фталоцианинатов лютеция. Показано, что полученные новые аналоги фталоцианинов являются перспективными составляющими полупроводниковых материалов. На основе субфталоцианиновых комплексов получены полупроводящие композиции и исследованы их электрофизические характеристики. Методами электронной спектроскопии поглощения в ближней ИК области и оптической микроскопии показано, что введение в молекулу гетеролептических комплексов в качестве заместителей фенильных групп способствует усилению внутримолекулярных  $\pi$ – $\pi$ -взаимодействий, как в растворах, так и в тонких пленках. Это приводит к снижению энергии активации, уменьшению удельного сопротивления и, соответственно, увеличению проводимости материалов на основе данных соединений.

Работа выполнена в рамках Государственного задания 2018 года (тема № 45.5 «Создание соединений с заданными физико-химическими свойствами»).

## Литература

1. C.G.Claessens, D.González-Rodríguez, T.Torres. *Chemical Reviews*, **102**, 835–854 (2002)
2. C.G.Claessens, D.González-Rodríguez, M.S.Rodríguez-Morgade, A.Medina, T.Torres. *Chemical Reviews*, **114**, 2192–2277 (2014)
3. Z.Chen, C.Xia, Y.Wu, X.Zuo, Y.Song. *Inorganic Chemistry Communications*, **9**, 187–191 (2006)
4. Y.Gu, Y.Wang, F.Gan. *Materials Letters*, **52**, 404–407 (2002)
5. Z.Liang, F.Gan, Z.Sun, X.Yang, L.Ding, Z.Wang. *Optical Materials*, **14**, 13–17 (2000)
6. T.V.Dubinina, M.M.Osipova, A.V.Zasedatelev, V.I.Krasovskii, N.E.Borisova, S.A.Trashin, L.G.Tomilova, N.S.Zefirov. *Dyes and Pigments*, **128**, 141–148 (2016)
7. C.G.Claessens, T.Torres. *Journal of the American Chemical Society*, **124**, 14522–14523 (2002)
8. G.Lu, M.Bai, R.Li, X.Zhang, C.Ma, P.C.Lo, D.K.P.Ng, J.Jiang. *European Journal of Inorganic Chemistry*, **2006**, 3703–3709 (2006)
9. S.S.Maklakov, T.V.Dubinina, M.M.Osipova, E.F.Petrusevich, A.D.Mishin, L.G.Tomilova. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, **20**, 1134–1141 (2016)
10. T.V.Dubinina, A.D.Kosov, E.F.Petrusevich, S.S.Maklakov, N.E.Borisova, L.G.Tomilova, N.S.Zefirov. *Dalton Transactions*, **44**, 7973–7981 (2015)

## Содержание

<b>Институту физиологически активных веществ Российской академии наук — 40 лет</b>	3
<b>Историческая фотогалерея</b>	5
<b>Работы в области медико-биологических исследований</b>	7
Новые подходы к созданию препаратов для лечения болезни Альцгеймера и сходных нейродегенеративных заболеваний <i>С.О. Бачурин</i>	9
Генетические модели нейродегенеративных процессов <i>Н.Н.Нинкина, А.А.Устюгов</i>	17
Роль белков фактора AP-1 в нейродегенерации и нейропротекции <i>Н.А.Маркова, Л.Н.Петрова, Е.Ф.Шевцова</i>	23
Гибридные молекулы на основе природного алкалоида секуринина в качестве потенциальных нейропротекторов <i>М.Е.Неганова, Е.Ф.Шевцова, С.Г.Клочков</i>	29
Влияние наружного кальция на интегральные токи в мембране клеток Пуркинье мозжечка крыс <i>В.Л. Замойский, В.В. Григорьев</i>	36
Сериновые эстеразы как мишени действия физиологически активных веществ <i>Г.Ф.Махаева</i>	39
Природные сесквитерпеновые лактоны как основа для создания мультитаргетных гибридных молекул с противоопухолевыми свойствами <i>С.Г.Клочков, М.Е.Неганова, С.А.Пухов, Л.А.Аникина, А.В.Семаков, С.В.Афанасьева</i>	51
Природные соединения растительного происхождения в противоопухолевой терапии <i>С.А.Пухов, С.В.Афанасьева, С.Г.Клочков</i>	83
Синтетический иммуноген для лечения опиоидной наркозависимости <i>М.А.Мяжкова, С.Н.Петроченко, Е.А.Орлова, Э.В.Боброва</i>	88
Иммунохроматографический анализ психоактивных веществ в биологических объектах <i>М.А.Мяжкова, С.Н.Петроченко, Е.А.Орлова</i>	94
Организация проведения доклинических испытаний химических веществ с фармакологической активностью в ЦДИ ИФАВ РАН <i>А.С.Кинзирский, В.О.Небогатиков</i>	100
<b>Работы в области синтетической органической химии</b>	105
Фосфорилсодержащие поданды. Синтез, свойства и перспективы практического применения <i>В.Е.Баулин</i>	107
Сорбция лекарственных препаратов аминомодифицированными лиогелями <i>С.А.Лермонтов, Н.А.Сипягина</i>	120

Аэрогели — синтез, свойства и практическое применение <i>С.А.Лермонтов, А.Н.Малкова, Н.А.Сипягина, Е.А.Страумал, Л.Л.Юркова, В.К.Иванов</i>	121
Двойная реакция Арбузова. Синтез фосфиновых кислот <i>В.В.Рагулин</i>	138
Методология синтеза фосфиновых пептидов — ингибиторов металлопротеиназ <i>М.Э.Дмитриев, В.В.Рагулин</i>	150
Модификация биологически активных амидов и аминов фторсодержащими гетероциклами <i>В.Б.Соколов, А.Ю.Аксиненко, Т.А.Епишина, Т.В.Горева</i>	157
Производные (3.2.2)циклазин-1,2-дикарбоновых кислот — перспективные макроциклические предшественники <i>А.С.Стариков, Ф.Е.Журкин, В.В.Калашиников, Л.Г.Томилова, В.Е.Пушкарёв</i>	164
1,4-Диазепинопорфиразины — новый класс структурных блоков для создания супрамолекулярных систем <i>Е.Н.Тараканова, П.А.Тараканов, Л.Г.Томилова, В.Е.Пушкарёв</i>	168
Изучение цитотоксической активности производных 5-амино-3-(2-аминопропил)-1,2,4-тиадиазола <i>Е.Л.Лузина, А.Н.Прошин, И.В.Серков, М.Г.Акимов, Е.В.Фомина-Агеева, В.В.Безуглов, Т.П.Трофимова, М.А.Орлова, С.О.Бачурин</i>	172
<b>Работы в области физико-химических исследований и компьютерного моделирования новых соединений</b>	177
Развитие компьютерного молекулярного дизайна <i>О.А.Раевский</i>	179
Особенности строения некоторых бензокраун-эфиров (ЯМР-исследования) <i>В.О.Завельский, В.П.Казаченко</i>	184
О природе сингулярностей в спектрах ПМР органических поликристаллов <i>В.О.Завельский</i>	189
ИК-Спектрометрическое определение нитропростона — нового NO-донорного препарата на основе простагландина <i>И.В.Серков, А.В.Ярков, В.В.Безуглов</i>	194
[18- $\pi$ ] + [14- $\pi$ ] Макроциклические системы состава фталоцианин – субфталоцианин как потенциальные материалы для нелинейной оптики <i>А.Ю.Толбин, В.Е.Пушкарёв, Л.Г.Томилова</i>	197
Новые аналоги фталоцианинов — перспективные составляющие полупроводниковых материалов <i>Т.В.Дубинина, А.Д.Косов, М.М.Осипова, С.С.Маклаков, Е.Ф.Петрусевич, В.Е.Пушкарёв, Л.Г.Томилова</i>	202



Институту физиологически активных веществ  
Российской академии наук 40 лет.  
**ИФВ РАН: основные направления и результаты работ.**

*Научный редактор*  
член-корр. РАН С.О.Бачурин

*Корректор*  
к.х.н. Е.В.Бовина  
*Компьютерная верстка*  
к.х.н. Е.В.Бовина

Издательство «Типография 24»  
109651 Москва, ул. Перерва, д. 19, стр. 1  
Тел.: (495)796–12-25

Подписано к печати с оригинал-макета 20.08.2018.  
Формат 60 × 90 1/8. Бумага офсетная. Гарнитура Times.  
Печатные листы 24,2. Тираж 150 экз.



Редактор С.О. Бачурин  
Компьютерная верстка Е.В. Бовина  
Фотографии М.Е. Неганова  
Дизайн обложки Л.М. Николенко

© 2018 ИФАВ РАН, Черногловка