



СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ
"СВ. КЛИМЕНТ ОХРИДСКИ"

ФАКУЛТЕТ ПО ХИМИЯ И ФАРМАЦИЯ
Катедра по органична химия и фармакогнозия

Савина Ивайлова Стоянова

***Рационален дизайн, синтез и in vitro изследване на
метаболитни модулатори – инхибитори на
карнитин ацилтрансфери***

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертация за присъждане на научната и образователна степен

”Доктор”

по професионално направление 4.2. Химически науки (Органична химия)

Научен ръководител: проф. д-р Милен Богданов

София, 2025 г.

Дисертационният труд съдържа 153 страници, включващи 58 фигури, 7 схеми и 8 таблици. Библиографията се състои от 249 литературни източника. Резултатите са публикувани в две научни публикации и са представени на общо 7 научни форума. Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на заседание на Катедрения съвет на Катедра Органична химия и фармакогнозия към Факултет по химия и фармация на СУ „Св. Климент Охридски“, състоял се на 11.04.2025 г.

Защитата на дисертационния труд ще се проведе на 2025 г. от часа в зала на Факултет по химия и фармация, Софийски университет, бул. Дж. Баучер №1, гр. София.

Съдържание

Въведение	1
1. Резултати и обсъждане	4
1.1. Рационален дизайн и молекулен докинг	5
1.2. Синтез и охарактеризиране	16
1.2.1. Синтез и охарактеризиране на серия хетероциклени гама-бутиробетаини	16
1.2.2. Синтез и охарактеризиране на серия изокумаринови производни	18
1.2.3. Синтез и охарактеризиране на серия йонни течности	27
1.3. <i>In vitro</i> изследвания	31
1.3.1. Определяне на инхибираща активност	32
1.3.1.1. Определяне на IC₅₀ на серия хетероциклени гама-бутиробетаини	34
1.3.1.2. Определяне на инхибираща активност на серия изокумаринови производни	36
1.3.1.3. Определяне на IC₅₀ на серия йонни течности	39
1.3.2. Определяне механизма на инхибиране на най-активните съединения	45
Обобщение и изводи	51
Литература	53
Научни публикации по темата на дисертацията	57
Участия в научни форуми, на които са представени резултатите от изследванията	58

Въведение

Затлъстяването, диабет тип 2 и раковите заболявания са сред най-актуалните предизвикателства за общественото здраве в световен мащаб. Според данни на Световната здравна организация (World Health Organisation, WHO), над 650 млн. възрастни страдат от затлъстяване към настоящия момент [Liang, 2024], а Международната диабетна федерация (International Diabetes Federation, IDF) отбелязва, че към 2021 г. диабет тип 2 засяга над 537 млн. души, с тенденция за покачване до 643 млн. през 2030 г. и 783 млн. през 2045 г. [Ruze et al., 2023]. Паралелно с това, анализ на Международната агенция за изследване на рака (The International Agency for Research on Cancer, IARC) потвърждава връзката между затлъстяването и повишения риск от някои видове рак, включително този на гърдата, черния дроб и дебелото черво [Lauby-Secretan et al., 2016; Morris & Edwards, 2018]. В научната литература и клиничната практика са налични и редица данни за връзката между затлъстяването и възникването на сърдечно-съдови заболявания, инсулинова резистентност, хронични възпалителни процеси и др. [Althumiri et al., 2021]

Изброените, на пръв поглед несвързани клинични състояния, могат да бъдат описани с общ патогенетичен механизъм, свързан с нарушения в метаболизма на глюкозата и мастните киселини (МК), като последният се явява основен фактор за възникването им. Взаимовръзката между метаболитните пътища на тези основни енергийни източници е известна като „цикъл на Рандъл“ – процес, описан още през 1963 г. [Randle et al., 1963] и обясняващ конкурентния механизъм на оползотворяването на глюкозата и МК на клетъчно ниво и свързаните ефекти при доминация на единия от двата процеса. При високи нива в кръвта, МК стават предпочетен източник на енергия за клетките, което води до инхибиране на ключови ензими, напр. пируват дехидрогеназа [Rahimi et al., 2014]. Мастните киселини блокират и ефектите на инсулина, което възпрепятства усвояването на глюкоза от мускулите и черния дроб, и допринася за развитието на инсулинова резистентност и хипергликемия – ключови елементи в патогенезата на сърдечно-съдови заболявания, диабет, рак и др. [Foley, 1992] Прекомерното разграждане на МК чрез β -окисление повишава и оксидативния стрес, причинен от

повишеното производство на реактивни кислородни частици, което уврежда клетъчните структури и допринася за развитието на хронични възпаления. Липотоксичността, свързана с натрупването на токсични липидни метаболити като свинголипиди и церамиди в тъканите се свързва с процеса на стареене и води до дисфункция на органите, особено на черния дроб и панкреаса [Laurila et al., 2022]. И тъй като инхибирането на прекомерното окисление на МК определя множество ползи за здравето, свързани с метаболитната регулация, то представлява обещаваща терапевтична стратегия по отношение на описаните по-горе състояния [Trabjerg et al., 2023; Wang et al., 2021].

Съвременните разработки за понижаване степента на β -окислението на МК като терапевтичен подход включват няколко перспективни направления, сред които: инхибиране на техния синтез (ацетил-CoA карбоксилазни инхибитори) [Wakil & Abu-Elheiga, 2009]; инхибиране на транспорта им в митохондриите (CPT1 и FATP инхибитори) [Black et al., 2009]; и инхибиране на окислението им (PPAR модулатори) [Feldman et al., 2008]. Въпреки постигнатите обещаващи резултати относно активността на съответните инхибитори, остават и нерешени проблеми свързани с хепатотоксичност, мускулна слабост или изискване за високи терапевтични дози. Идеалният инхибитор трябва да бъде селективен, действайки предимно в черния дроб и мастната тъкан, без да засяга сърдечния мускул.

Карнитин ацилтрансферазите (CAT) са семейство ензими, които играят важна роля в биоенергетичните процеси в човешките и животински клетки. Те участват активно в регулирането и осъществяването на окислението на МК, чрез катализиране на обратимата реакция на обмен на киселинни остатъци между молекулите на L-карнитин и CoA. Тази група ензими включва три представителя, всеки от които отговаря за транспорта на мастни киселини с различна дължина на веригата между цитозола, митохондриите и пероксизомите в клетката. Това са карнитин ацетилтрансфераза (CrAT), карнитин октаноилтрансфераза (COT) и карнитин палмитоилтрансфераза (CPT).

През последните няколко десетилетия са проведени редица изследвания за изясняване на структурата и функциите им, както и за откриването на потенциални модулатори на тяхното действие. В резултат на това, карнитин ацилтрансферазите се очертават като обещаваща цел за справяне с различни хронични състояния, включително сърдечно-съдови

заболявания [Nechaeva & Zheltikova, 2015; Liamina et al., 2014], диабет [Keung, et al., 2013], бъбречни [Durasevic et al., 2019] и чернодробни [Durasevic et al., 2021], психични [Morkholt et al., 2017] и невродегенеративни заболявания [Trabjerg et al., 2023]. В допълнение, актуални изследвания оспорват широко разпространеното убеждение, че раковите клетки зависят от глюкозата като основен енергиен източник, като подчертават ролята на засиленото разграждане на мастните киселини в стимулирането на канцеризацията на здравите тъкани [Gregory et al., 2022; Liu, 2006; Jariwala et al., 2021; Wang et al., 2024a; Monaco, 2017; Maher et al., 2018]. Инхибирането на окислението на МК се очертава като обещаваща терапевтична стратегия за третиране на различни видове рак, лишени от известни механизми на резистентност, характерни за конвенционалната цитотоксична химиотерапия [Wang et al., 2024a; Zhu et al., 2023; Ma et al., 2024].

От казаното дотук, става ясно че получаването на инхибитори на карнитин ацилтрансферазите представлява интерес поради възможността те да повлияват положително метаболитните процеси в организма. Това определи и **основната цел** на настоящата дисертация: синтез и *in vitro* изследване на потенциални метаболитни модулатори, които да проявяват ефектите си чрез инхибиране на транспорта на МК в клетките.

Използваната от нас методология и конкретни задачи включват:

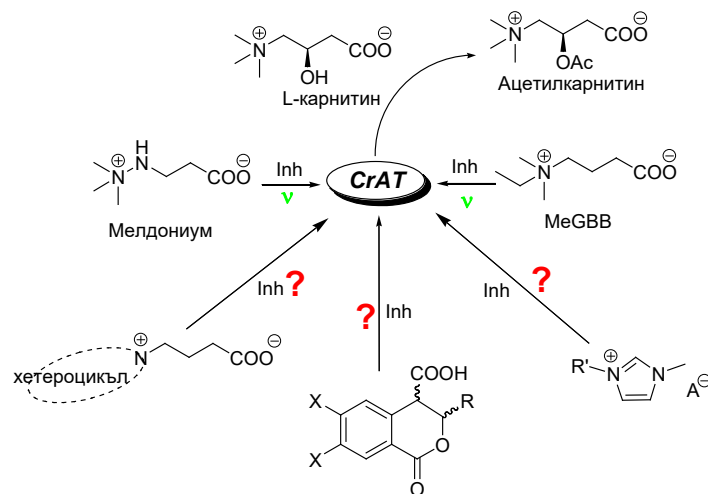
- рационален дизайн и молекулен докинг
- синтез и охарактеризиране на целевите съединения
- сравнителен анализ и оценка на тяхната инхибираща способност
- установяване на механизма на инхибиране за най-активните представители

Обект на изследване са три серии съединения: 1) хетероциклени гама-бутиробетаини; 2) изокумаринови производни и 3) йонни течности. Съединенията са избрани, поради структурно сходство с естествените субстрати на карнитин ацетилтрансфераза (*CrAT*) използван като моделен ензим. За целите на сравнителния анализ, в изследваната група са включени като положителни контроли и две съединения с доказана инхибираща способност върху *CrAT* – Мелдониум (одобрен лекарствен продукт за третиране на исхемична болест на сърцето, разпространяван под търговското наименование Mildronate®), както и MeGBB (препарат в III^{-та} фаза на клинично проучване).

1. Резултати и обсъждане

Основната цел на настоящата дисертация е синтез и *in vitro* изследване на потенциални метаболитни модулатори, които проявяват активността си чрез инхибиране на карнитин ацилтрансферази – група ензими, участващи в процеса на окисление на мастните киселини.

Използваната от нас методология включва рационален дизайн, молекулен докинг, синтез и охарактеризиране на целевите съединения, сравнителен анализ и оценка на тяхната инхибираща способност, и установяване на механизма на инхибиране за най-активните представители по отношение на карнитин ацетилтрансфераза (*CrAT*) като моделен ензим. Обект на изследване са три серии съединения: 1) хетероцикленни гама-бутиробетаини; 2) изокумаринови производни и 3) йонни течности (Фиг. 1). Съединенията са избрани, поради структурно сходство с естествените субстрати на целевия ензим. За целите на сравнителния анализ, в изследваната група са включени като положителни контроли и две съединения с доказана инхибираща способност върху *CrAT* – Мелдониум (одобрен лекарствен продукт за третиране на исхемична болест на сърцето, разпространяван под търговското наименование Mildronate®), както и MeGBB (препарат в III^{-та} фаза на клинично проучване).



Фигура 1. Схематично представяне на основната цел в настоящата дисертация.

1.1. Рационален дизайн и молекулен докинг

Познаването на структурата на активния център и специфичните взаимодействия със субстрата са от съществено значение за успешния дизайн на инхибитори и/или активатори за даден ензим. Въпреки различията по отношение на разпространението си в клетката, функции и аминокиселинната последователност, карнитин ацилтрансферазите имат значително сходство в структурата на активните си центрове. През 2003 г. е изолирана карнитин ацетилтрансфераза от мишка и е установено наличието на два структурни домена, между които се оформя „тунел“, който представлява активния център на ензима [Jog & Tong, 2003]. В центъра на този активен център се намира остатък от АК хистидин – His322 за човешка *CrAT* и His343 за *CrAT* изолиран от мишка, който има ключова роля за каталитичните свойства на ензима. Разположен в средата на каталитичния център, хистидиновият остатък има пряк достъп до местата на свързване на CoA и L-карнитин, които са разположени в противоположните страни на „тунела“. Азотният атом (N3) в състава на His се асоциира с хидроксилната група на L-карнитин или тиолната група на CoA посредством водородни връзки. На това взаимодействие се дължат каталитичните функции на карнитин ацетилтрансферазата, тъй като то води до пълно депротониране на хидроксилната или съответно тиолната група, която впоследствие участва в процеса на ацилно нуклеофилно заместване. Две години по-късно същият екип от учени успешно изолират и изследват кристалната структура на *COT* [Jog et al., 2005]. Двата ензима – *CrAT* и *COT*, имат над 35% сходство в първичната си структура. Подобно на *CrAT*, в средата на каталитичния център на карнитин октаноилтрансферазата се намира хистидинов остатък (His327), на който се дължат каталитичните свойства на ензима.

Поради тясната си свързаност с митохондриалната мембрана, кристали от *CPT1* не се изолирани и до днес. Въпреки това, поради сходството в първичната му структура с други ензими и с помощта на компютърно моделиране, е предложен модел и за неговата триизмерна структура [Morillas et al., 2004]. Подобно на другите карнитин ацилтрансферази, основен елемент за активността е наличието на хистидинов остатък в центъра на ензима – за *CPT1A* – His473. За разлика от *CPT1*, *CPT2* не е трансмембранен ензим, което позволява неговото изолиране – кристалната структура на *CPT2* е описана от Hsiao и колектив през 2006 г. [Hsiao et al., 2006]. Структурата на *CPT2* е сходна с тази на *CrAT* и *COT*, като трите ензима

споделят над 30% от първичната си структура. Подобно на другите карнитин ацилтрансферази, *CPT2* се състои от два структурни домена, между които се оформя активният център на ензима с хистидинов остатък в центъра му, His372.

Освен разположението на активния център и наличието на важния хистидинов фрагмент, трите вида карнитин ацилтрансферази – *CrAT*, *COT* и *CPT*, имат сходна структура на активния център за свързване на L-карнитин. В Таблица 1 е показана аминокиселинната последователност на този център, като в удебелен шрифт и подчертани са тези аминокиселини, които имат ключова роля за свързването на субстрата. Сходството в състава на този център се запазва, както между трите вида карнитин ацилтрансферази, така и между ензими изолирани от различните биологични видове.

Това структурно съответствие предполага и висока степен на припокриване на специфичните взаимодействия ензим-субстрат и ензим-инхибитор, и позволява изведените зависимости за един от разглежданите ензими да бъдат успешно отнесени и към другите.

Таблица 1. АК секвенция на активния център за *CAT* изолирани от човек, мишка, гъльб и плъх. Аминокиселините, участващи пряко в свързването на субстрата към ензима са подчертани.

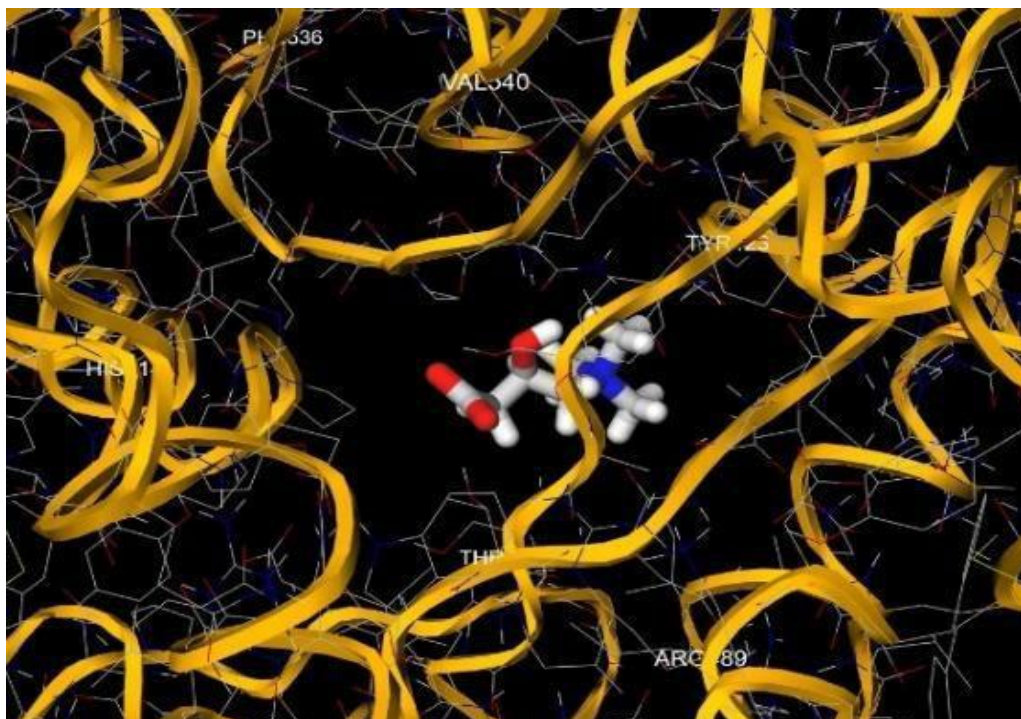
	АК секвенция	Номер на АК	АК секвенция	Номер на АК	АК секвенция	Номер на АК
Човек (<i>CrAT</i>)	TYESASL R MFHLGR I D	430-445	GEAFD R HLLGL	492-502	DCVMF F GP V VP	540-550
Мишка (<i>CrAT</i>)	TYESASL R MFHLGR I D	451-466	GEAFD R HLLGL	513-523	DCVMF F GP V VP	561-571
Мишка (<i>CrAT</i>) ¹	TYESASL R MFHLGR I D	422-437	GEAFD R HLLGL	484-494	DCVMF F GP V VP	532-542
Гъльб (<i>CrAT</i>)	TYESASL R MFRLGR I D	453-468	GNAID R HLLGL	514-524	DCVM C EP V VP	562-572
Човек (<i>COT</i>)	CYETAM T RHFYHG R TE	438-453	GKGFD R HLLGL	500-510	RVQGV V VP M VH	550-560
Човек (<i>CPT1</i>)	TYEAS M TR L FR E GR I E	588-603	GSGID R HLFCL	650-660	SSGG F EP V AP	707-717
Човек (<i>CPT2</i>)	TYESC S TAAFKHG R TE	485-500	GQGF D RHLFAL	549-559	VNLGG F AP V VS	598-608
Плъх (<i>CPT2</i>) ²	TYESC S TAAFKHG R TE	454-469	GQGF D RHLFAL	518-528	VSLGG F AP V VP	566-576

¹ Данни за *CrAT* изолиран от мишка (*Mus musculus*), използвани за докинг изследванията в настоящата дисертация.

² Данни за *CPT2* изолиран от плъх (*Rattus norvegicus*), използвани за докинг изследванията в настоящата дисертация.

Специфичните взаимодействия, които са установени при асоцииране на естествения субстрат L-карнитин към активния център на ензима са водородни връзки, хидрофобни и л-катион взаимодействия (Фиг. 2, Фиг. 3), като асоциирането на азотният атом (N3) в състава на хистидина с хидроксилната група на L-карнитин е ключово за каталитичните функции на карнитин ацилтрансферазите. Отрицателният заряд на карбоксилната група на L-карнитин

се стабилизира чрез образуване на водородни връзки между двата кислородни атома от групата и аминокиселините тирозин, аргинин и треонин – Tyr431, Arg497 и Thr444 за *CrAT*, изолиран от човек (*Homo sapiens*, PDB идентификатор: 1S5O) [Govindasamy et al., 2004], и Tyr423, Arg489 и Thr436 за *CrAT* от мишка (*Mus Musculus*, PDB идентификатор: 1NDF) [Jogl & Tong, 2003].



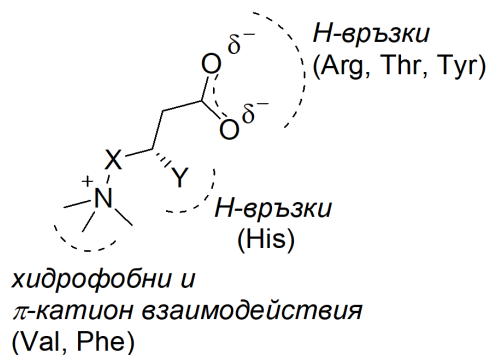
Фигура 2. Илюстрация на разположението на L-карнитин в активния център на *CrAT* (*Mus musculus*, PDB identifier: 1NDF) [Jogl & Tong, 2003] с отбелязани важните за активността АК.

Четвъртичният азотен атом на субстрата се намира в хидрофобен джоб. Положителният заряд на групата се стабилизира посредством хидрофобни взаимодействия с аминокиселината валин и чрез π -катион взаимодействие с фенилаланин, за ензим изолиран от човек (*Homo sapiens*, PDB идентификатор: 1S5O) [Govindasamy et al., 2004] – Val548 и Phe545, и Val540 и Phe536 за ензим от мишка (*Mus Musculus*, PDB идентификатор: 1NDF) [Jogl & Tong, 2003].

Карнитин ацилтрансферазите имат съществена разлика в центъра за свързване на карбоксилните киселини. В структурата на *CPT1* и *CPT2*, хидрофобният джоб, към който се асоциира въглеводородната верига на киселината, е значително по-голям. Това се дължи на факта, че в тяхната първична структура са заменени обемистите АК Val534, Met535 и Phe536 от структурата на *CrAT* от мишка (*Mus Musculus*, PDB идентификатор: 1NDF) със

съответно Gly709, Gly710 и Gly711 за *CPT1* и Leu600, Gly601 и Gly602 при *CPT2* [Morrilas et al., 2004; Ramsay et al., 2001]. Подобна промяна води до образуване на кухина в активния център, което позволява на дългата „опашка“ на висшите мастни киселини да заемат пространството в хидрофобния джоб. Подобна замяна се наблюдава и в структурата на *COT*, където обемистите АК Met535 и Phe536 в структурата на *CrAT* от мишка (*Mus Musculus*, PDB идентификатор: 1NDF) са заменени съответно с Gly553 и Val554 при *COT*.

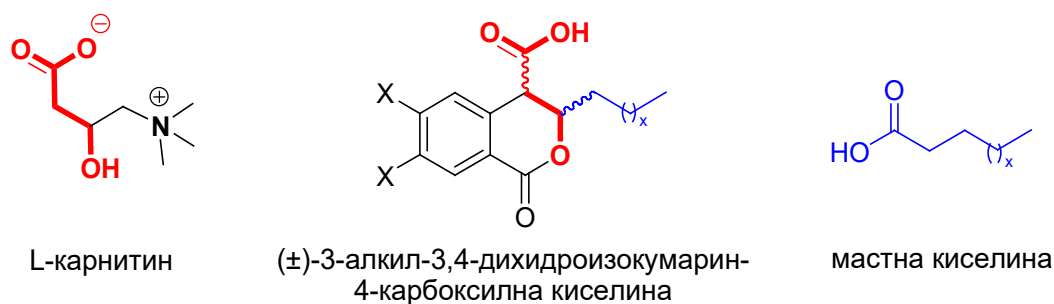
На база така направения анализ, ние изведохме хипотезата, че *въвеждането на хетеропръстен като заместител в гама-позиция на бутановата киселина, като структурен аналог на L-карнитин, ще е предпоставка за засилване на хидрофобните и π -катион взаимодействия в хидрофобния джоб на ензима, което би довело до по-ефективно инхибиране на *CrAT* в сравнение с Мелдониум и MeGBB, при които отсъстват пръстенни заместители, съдържащи кватернерния азотен атом (вж. Таблица 2). В допълнение, включването на ароматен заместител може да е предпоставка за възникването на π - π взаимодействия, което да повиши допълнително афинитета на тези аналози към активния център на ензима (Фиг. 3).*



Фигура 3. Схематично представяне на специфичните взаимодействия в ензим-субстратния комплекс на: L-карнитин: X = CH₂; Y = OH; R = R = R' = CH₃; Мелдониум: X = NH; Y = H; R = R = R' = CH₃; MeGBB: X = CH₂; Y = H; R = R = CH₃; R' = CH₂CH₃; хетероциклени гама-бутиробетаини: X = CH₂; Y = H; R = R = циклична система; R' = CH₃; хетероароматни гама-бутиробетаини: X = CH₂; Y = H; R = R = R' = ароматна система.

(\pm)-3-алкил-3,4-дихидроизокумарин-4-карбоксилните киселини са изокумаринови производни с карбоксилна група при C4 и алкилов заместител при C3. Те могат да се разглеждат като структурни аналози на едни от най-изследваните инхибитори на *CAT* – Етомоксир, Кломоксир, HBS, както и на потентния инхибитор на *FAS* C75.

Свободната карбоксилна група и кислородният атом в β -позиция спрямо нея в структурата на тези съединения наподобяват молекулата на L-карнитин, докато алкиловият заместител при C3 – въглеводородната верига в състава на висшите мастни киселини (Фиг. 4). По този начин, целевите съединения са и молекулни хибриди, обединяващи в структурата си фрагменти от отделните субстрати, а наличието на лактонов пръстен би довело до понижена реактивност и повишена селективност. Последното е предпоставка за по-ниска токсичност в сравнение с Етомоксир и Кломоксир, които съдържат силно реактивен оскиранов пръстен в структурата си.

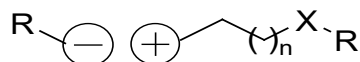


Фигура 4. Молекулата на (±)-3-алкил-3,4-дихидроизокумарин-4-карбоксилните киселини съдържа фрагменти от структурата на два от естествените субстрати на CrAT – L-карнитин и висшите мастни киселини, и е аналог на един от най-изследваните инхибитори на CrAT – Етомоксир.

Въз основа на горния анализ, предположихме, че (±)-3-алкил-3,4-дихидроизокумарин-4-карбоксилните киселини могат да взаимодействат както с активния център за свързване на CrAT с L-карнитин, така и с този на мастните киселини. Това се очаква да доведе до по-ефективно инхибиране на CrAT в сравнение с Мелдониум и MeGBB, при които липсва β -хидроксилна група и дълъг хидрофобен фрагмент. В допълнение, въвеждането на две кислород-съдържащи групи в 6-та и 7-ма позиция в изокумариновата структура може да окаже положително въздействие върху афинитета на молекулите към активния център на ензима, поради възможността за образуване на допълнителни водородни връзки, а наличието на ароматен пръстен – и на π - π взаимодействия.

Благодарение на своите уникални характеристики, ИТ намират все по-голямо приложение в практиката, но засиленият интерес и все по-масовата им употреба прави актуален и въпроса за тяхната токсичност и влияние върху живите организми, както в краткосрочен, така и в дългосрочен план. С цел по-задълбочено изучаване и установяване на връзките структура – активност (SAR), ние си поставихме за задача да изследваме тяхното

влияние върху активността на *CrAT*. Освен от фундаментална гледна точка, подобни изследвания са от голямо значение, тъй като високата стабилност, липсата на летливост и ограничена биоразградимост могат да доведат до натрупването на ЙТ в определени екосистеми и съответно включването им в хранителни вериги. По този начин, ЙТ биха могли да попаднат и в човешкия организъм, и всяко знание относно тяхното действие би допринесло за навременно предотвратяване на потенциален проблем в глобален мащаб. От друга страна, установяването на активност за ЙТ, в комбинация с доказана ниска токсичност би довело до разработването на нови лекарствени продукти. Като се вземе предвид общата структура на ЙТ представена на Фиг. 5, не е нелогично да се направи предположение, че те могат да се разглеждат като „деструктурирани“ бетаини, чиито фрагменти също биха взаимодействали ефективно със специфичните АК, съставляващи активния център на *CrAT*, и по този начин да проявяват инхибираща активност.











Фигура 5. Йонните течности могат да се разглеждат като „деструктурирани“ бетаини.

За да потвърдим или отхвърлим изведените хипотези, първоначално проведохме теоретични изследвания (молекулен докинг) с цел сравняване на афинитета на съединенията от първите две групи от хипотетични инхибитори на *CAT* с този на природния субстрат – L-карнитин, и инхибиторите Мелдониум и MeGBB. Изследването бе проведено посредством свободно достъпната онлайн платформа Mcule (<http://mcule.com>) с използването на наличните структури за *CrAT*, изолиран от мишка (*Mus musculus*, PDB идентификатор: 1NDI) и *CPT2*, изолиран от плъх (*Rattus Norvegicus*, PDB идентификатор: 2FW3).

Като потенциални заместители в структурата на първата серия от съединения – хетероциклените гама-бутиробетаини, бяха избрани алифатните третични амини *N*-метилпиролидин, *N*-метилпиперидин и *N*-метилморфолин, а като ароматни представители – *N*-метилимидазол, пиридин, *N,N*-диметиламинопиридин, изохинолин и хинолин. За оценка на степента на важност на фактора водородни връзки, в групата от изследвани съединения бяха включени и бромидите на съответните етилови естери на кватернерните гама-бутиробетаини.

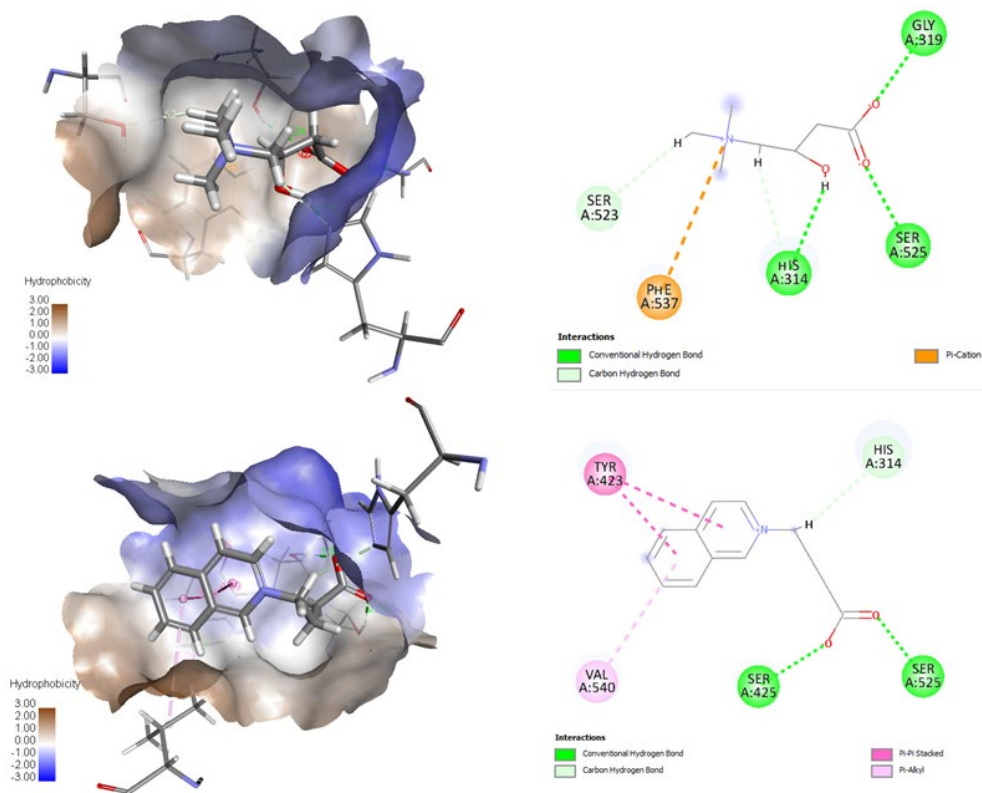
Структурата на изследваните съединения и получените резултати са обобщени в Таблица 2, като по-високата абсолютна стойност показва по-висок афинитет на свързване на инхибитора с активния център.

Таблица 2. Теоретично изчислен афинитета на изследваните хетероциклени гама-бутиробетаини.

Съединение	Абревиатура	R	R'	X	A ⁻	CrAT	CPT2
	L-карнитин					-4.5	-4.5
	Мелдониум					-4.5	-4.4
	MeGBB		-CH ₃	O ⁻	-	-4.6	-4.7
	MeGBB-естер		-CH ₃	OEt	Br ⁻	-4.8	-5.0
1	Pyrr-GBB		-CH ₃	O ⁻	-	-5.3	-5.4
	1-естер		-CH ₃	OEt	Br ⁻	-5.3	-5.4
2	Pip-GBB		-CH ₃	O ⁻	-	-5.4	-5.6
	2-естер		-CH ₃	OEt	Br ⁻	-5.8	-5.5
3	Morph-GBB		-CH ₃	O ⁻	-	-5.1	-5.2
	3-естер		-CH ₃	OEt	Br ⁻	-5.4	-5.6
4	Mim-GBB		-	O ⁻	-	-5.1	-5.3
	4-естер		-	OEt	Br ⁻	-5.2	-5.1
5	Pyr-GBB		-	O ⁻	-	-5.7	-5.5
	5-естер		-	OEt	Br ⁻	-5.7	-6.1
6	DMAP-GBB		-	O ⁻	-	-6.0	-6.3
	6-естер		-	OEt	Br ⁻	-5.9	-6.4
7	<i>i</i> -qui-GBB		-	O ⁻	-	-7.2	-7.2
	7-естер		-	OEt	Br ⁻	-7.2	-7.3
8	Qui-GBB		-	O ⁻	-	-7.1	-6.7
	8-естер		-	OEt	Br ⁻	-7.2	-6.8

Според получените резултати, с изключение на стандартите Мелдониум и MeGBB, всички бетаини демонстрират по-голям афинитет на свързване всравнение с този на природния субстрат L-карнитин. Някои ароматни съединения имат стойности, подобни на техните алифатни аналози, напр. Pip-GBB (2) и Pyr-GBB (5); Pyrr-GBB (1) и Mim-GBB (4)], което предполага, че допълнителните π-π взаимодействия не оказват значително влияние върху активността. Тенденция на нарастване на афинитета с увеличаване на обема на заместителите показва засилени хидрофобни взаимодействия [Mim-GBB (4) < Pyr-GBB (5) < DMAP-GBB (6) < *i*-qui-GBB (7) ≈ Qui-GBB (8)]. Съединения 7 и 8, съдържащи най-обемистите

заместители, съответно изохинолин и хинолин, показват най-високо сродство. Противно на очакванията ни, солите на етиловите естери дават резултати близки или равни на съответстващите им бетаини. Това не корелира с наличните експериментални данни [Fritz & Schultz, 1965], които ясно показват значимостта на свободния карбоксилатен йон за ефективно взаимодействие с ензима. Независимо от това, в подкрепа на първоначално изведената хипотеза, проведохме по-нататъшно изследване на автоматично генерираните докинг пози с най-ниска енергия на свързване (най-висок афинитет на свързване) за естествения субстрат L-карнитин (Фиг. 6, горе) и най-активното съединение 7 (Фиг. 6, долу) с *CrAT* (*Mus musculus*, PDB идентификатор: 1NDI) [Jogl & Tong, 2003]. Резултатите показаха, че специфичните взаимодействия в активния център, произтичащи от включването на хетероцикъл като заместител в гама-позицията на бутановата киселина, засилват хидрофобните взаимодействия в хидрофобния джоб на ензима и за това смятаме, че разглежданите съединения ще са потенциални конкурентни инхибитори на *CrAT*.

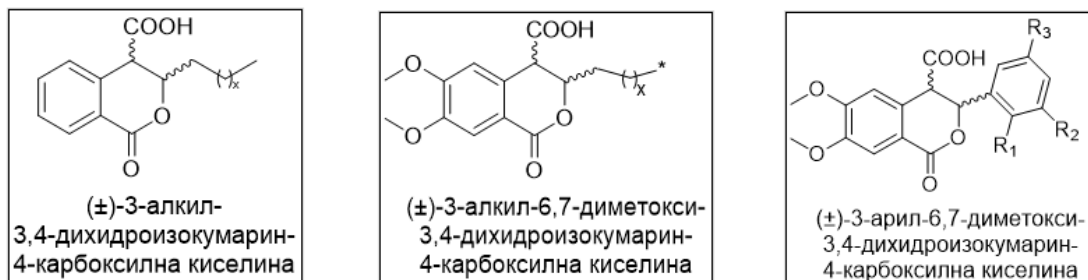


Фигура 6. 3D и 2D визуализации на докинг позите, притежаващи най-ниска енергия на свързване (най-висок афинитет на свързване) със специфичните взаимодействия между активния център на *CrAT* (*Mus musculus*, PDB идентификатор: 1NDI) [Jogl & Tong, 2003] и естествения субстрат L-карнитин (горе) и най-активното съединение в серията **7** (долу).

Втората серия от целеви съединения е съставена от 3-заместени 3,4-дихидроизокумарин-4-карбоксилни киселини и техните 6,7-диметокси аналози (Таблица 3). За да оценим ефекта на дължината на въглеродородната верига в позиция 3 на бензопирановия скелет, избрахме четири алкилови заместителя – пропилов, хептилов, нонилов и децилов, а за този на вида на заместителя в същата позиция допълнихме серията с три 3-арил заместени аналога, съдържащи съответно фенилов, 2,3-диметоксифенилов и 2,5-диметоксифенилов фрагмент. Влиянието на стерохимичния фактор оценихме посредством изследване на възможните четири стереоизомера за всяко съединение. За целите на сравнителния анализ в изследванията бяха включени и съответните ацилирани продукти – ацетил-L-карнитин, ацетил-CoA и палмитоил-CoA, както и положителните контроли Мелдониум и MeGBB. Резултатите от проведените докинг изследвания и общата структура на съединенията са представени в Таблицы 3, а 3D и 2D визуализация на позите за един от най-перспективните инхибитори по отношение на *CrAT* (*Mus musculus*, PDB идентификатор: 1NDI) и *CPT1* (*Rattus Norvegicus*, PDB идентификатор: 2FW3) на Фигура 7.

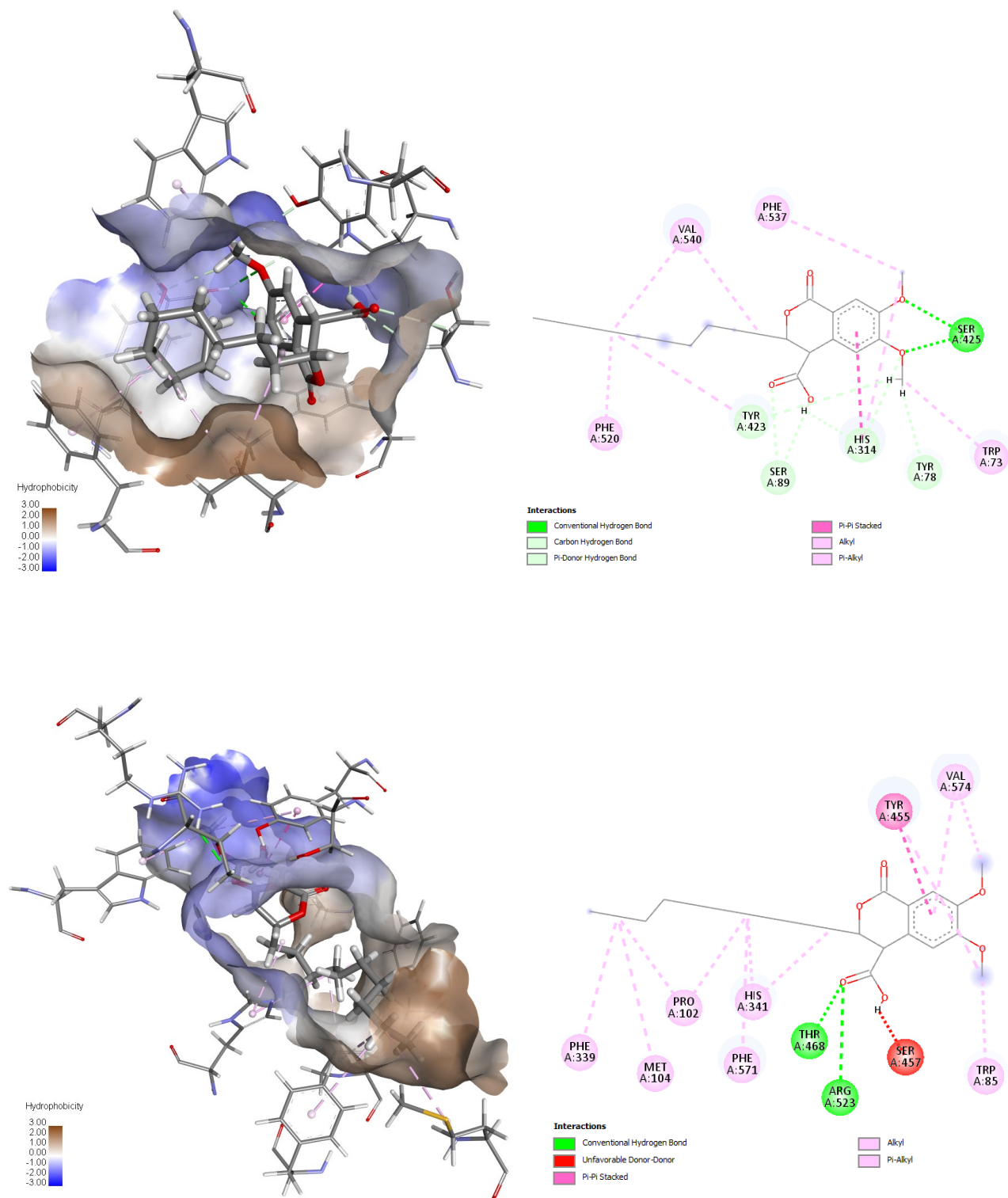
Резултатите показват, че всички съединения демонстрират по-висок афинитет на свързване от естествените субстрати на *CrAT* и *CPT1* – L-карнитин, ацетил-CoA (*CrAT*), палмитоил-CoA (*CPT1*). Според изчислените стойности, те имат потенциал да бъдат по-ефективни инхибитори от Мелдониум и MeGBB, което е в съответствие с изведената от нас хипотеза, че последните взаимодействат само с един от трите джоба в активния център на ензима, докато изокумарините наподобяват структурно както L-карнитин, така и мастни киселини, което е предпоставка за взаимодействие с повече от една от специфичните зони в активните центрове. В допълнение, изчислената позиция на въглеродородния остатък в 3-то място на 3R,4S изомера на изокумарина *транс*-diOMe-iC10 показва предпочетено разположение в хидрофобния джоб, основен елемент от активния център за свързване с мастните киселини и за двата ензима, което отново е в подкрепа на нашата хипотеза (Фиг. 7). Съществена разлика е конформацията на алкиловия заместител, който е по-нагънат при *CrAT*. Това е в съответствие с големината на хидрофобния джоб, който определя специфичната активност на отделните ензими по отношение на дължината на мастно-киселинния остатък. Интересен е и фактът, че съединението заема конформация със синклинално разположени водородни атоми при C-3 и C-4, което е нетипично за 3,4-

диазаместените *транс*-диастереомерни съединения. Този феномен бе изследван по-задълбочено, а резултатите са дискутирани в следващия раздел.



	x	R ₁	R ₂	R ₃	CrAT			
L-карнитин					-4.5			
AcCoA					-5.8			
Ацетил-L-карнитин					-5.0			
Мелдониум					-4.5			
MeGBB					-4.6			
iC3	1	-	-	-	(3R,4R)-цис: -5.9	(3S,4S)-цис: -6.5	(3S,4R)-транс: -6.1	(3R,4S)-транс: -6.2
iC7	5	-	-	-	(3R,4R)-цис: -6.2	(3S,4S)-цис: -6.5	(3S,4R)-транс: -5.5	(3R,4S)-транс: -6.5
iC9	7	-	-	-	(3R,4R)-цис: -6.4	(3S,4S)-цис: -6.4	(3S,4R)-транс: -5.5	(3R,4S)-транс: -6.3
iC10	8	-	-	-	(3R,4R)-цис: -6.2	(3S,4S)-цис: -5.8	(3S,4R)-транс: -6.5	(3R,4S)-транс: -6.1
diOMe-iC3	1	-	-	-	(3R,4R)-цис: -6.5	(3S,4S)-цис: -6.0	(3S,4R)-транс: -5.9	(3R,4S)-транс: -5.9
diOMe-iC7	5	-	-	-	(3R,4R)-цис: -6.6	(3S,4S)-цис: -5.7	(3S,4R)-транс: -6.1	(3R,4S)-транс: -6.4
diOMe-iC9	7	-	-	-	(3R,4R)-цис: -6.2	(3S,4S)-цис: -5.6	(3S,4R)-транс: -5.9	(3R,4S)-транс: -6.0
diOMe-iC10	8	-	-	-	(3R,4R)-цис: -6.0	(3S,4S)-цис: -5.6	(3S,4R)-транс: -6.0	(3R,4S)-транс: -5.4
diOMe-iC-Ph	-	H	H	H	(3S,4R)-цис: -6.9	(3R,4S)-цис: -6.8	(3S,4S)-транс: -6.9	(3R,4R)-транс: -6.6
diOMe-iC-2,3-diOMe	-	OMe	OMe	H	(3S,4R)-цис: -6.8	(3R,4S)-цис: -6.4	(3S,4S)-транс: -7.0	(3R,4R)-транс: -7.0
diOMe-iC-2,5-diOMe	-	OMe	H	OMe	(3S,4R)-цис: -6.4	(3R,4S)-цис: -6.7	(3S,4S)-транс: -7.0	(3R,4R)-транс: -6.8
	x	R ₁	R ₂	R ₃	CPT2			
L-карнитин					-4.5			
Палмитоил-CoA					-4.6			
Мелдониум					-4.4			
MeGBB					-4.7			
Етомоксир					-7.2			
iC3	1	-	-	-	(3R,4R)-цис: -7.6	(3S,4S)-цис: -7.4	(3S,4R)-транс: -7.3	(3R,4S)-транс: -7.2
iC7	5	-	-	-	(3R,4R)-цис: -6.0	(3S,4S)-цис: -8.4	(3S,4R)-транс: -7.6	(3R,4S)-транс: -7.0
iC9	7	-	-	-	(3R,4R)-цис: -8.2	(3S,4S)-цис: -7.3	(3S,4R)-транс: -7.9	(3R,4S)-транс: -7.5
iC10	8	-	-	-	(3R,4R)-цис: -7.5	(3S,4S)-цис: -7.6	(3S,4R)-транс: -8.1	(3R,4S)-транс: -7.6
diOMe-iC3	1	-	-	-	(3R,4R)-цис: -7.4	(3S,4S)-цис: -7.4	(3S,4R)-транс: -7.4	(3R,4S)-транс: -7.2
diOMe-iC7	5	-	-	-	(3R,4R)-цис: -7.1	(3S,4S)-цис: -7.1	(3S,4R)-транс: -7.0	(3R,4S)-транс: -7.8
diOMe-iC9	7	-	-	-	(3R,4R)-цис: -7.7	(3S,4S)-цис: -7.2	(3S,4R)-транс: -7.1	(3R,4S)-транс: -7.5
diOMe-iC10	8	-	-	-	(3R,4R)-цис: -7.3	(3S,4S)-цис: -7.7	(3S,4R)-транс: -7.7	(3R,4S)-транс: -7.3
diOMe-iC-Ph	-	H	H	H	(3S,4R)-цис: -8.6	(3R,4S)-цис: -8.1	(3S,4S)-транс: -8.7	(3R,4R)-транс: -8.6
diOMe-iC-2,3-diOMe	-	OMe	OMe	H	(3S,4R)-цис: -8.3	(3R,4S)-цис: -8.3	(3S,4S)-транс: -8.3	(3R,4R)-транс: -8.3
diOMe-iC-2,5-diOMe	-	OMe	H	OMe	(3S,4R)-цис: -8.4	(3R,4S)-цис: -8.3	(3S,4S)-транс: -8.3	(3R,4R)-транс: -8.5

Таблица 3. Теоретично изчислен афинитета на 3-алкилзаместени 3,4-дихидроизокумарин-4-карбоксилни киселини и 3-алкил/арилзаместени 6,7-диметокси-3,4-дихидроизокумарин-4-карбоксилни киселини по отношение на CrAT, изолиран от мишка (*Mus musculus*, PDB идентификатор: 1NDI) и CPT2, изолиран от плъх (*Rattus Norvegicus*, PDB идентификатор: 2FW3).



Фигура 7. 3D и 2D визуализации на докинг пози за 3R,4S изомера за *транс*-diOMe-iC10, притежаващ най-ниска енергия на свързване, и специфичните взаимодействия в активния център на *CrAT* (горе) и *CPT1* (долу). Въглеродният остатък в 3-та позиция предпочетено се разполага в хидрофобния джоб съгласно спецификата на неговия размер.

1.2. Синтез и охарактеризиране

1.2.1. Синтез и охарактеризиране на серия хетероциклени гама-бутиробетаини

Първата серия от съединения – хетероциклените гама-бутиробетаини, бе синтезирана съгласно процедура описана от Tars и съавтори [Tars et al., 2014], използвана за получаването на голям брой алифатни аналози на Мелдониум. Първият етап е заместителна реакция на избрания амин и етил 4-бромобуаноат. Вторият етап е процес на хидролиза с получаване на целевия хетероциклен гама-бутиробетаин (Схема 3).

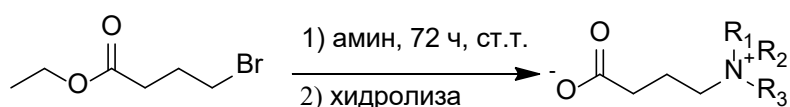


Схема 3. Синтез на хетероциклени гама-бутиробетаини.

Първият етап на процеса по получаване на целевите съединения проведохме в среда от ацетонитрил при стайна температура за 72 ч. Разтворителят бе избран заради неговия полярен характер. Поради образуващите се в хода на реакцията кватернерен азотен атом и бромиден анион, преходното състояние на процеса се характеризира със съответно частичен положителен заряд при азотния атом и частичен отрицателен заряд при бромидния. Провеждането на синтеза в среда от полярен разтворител като ацетонитрил би понижило активиращата енергия на реакцията, поради стабилизиране на образуващите се частични заряди в преходното състояние. В допълнение, ацетонитрилът е апротонен разтворител и като такъв той не дезактивира използвания като изходен реактив амин чрез протониране.

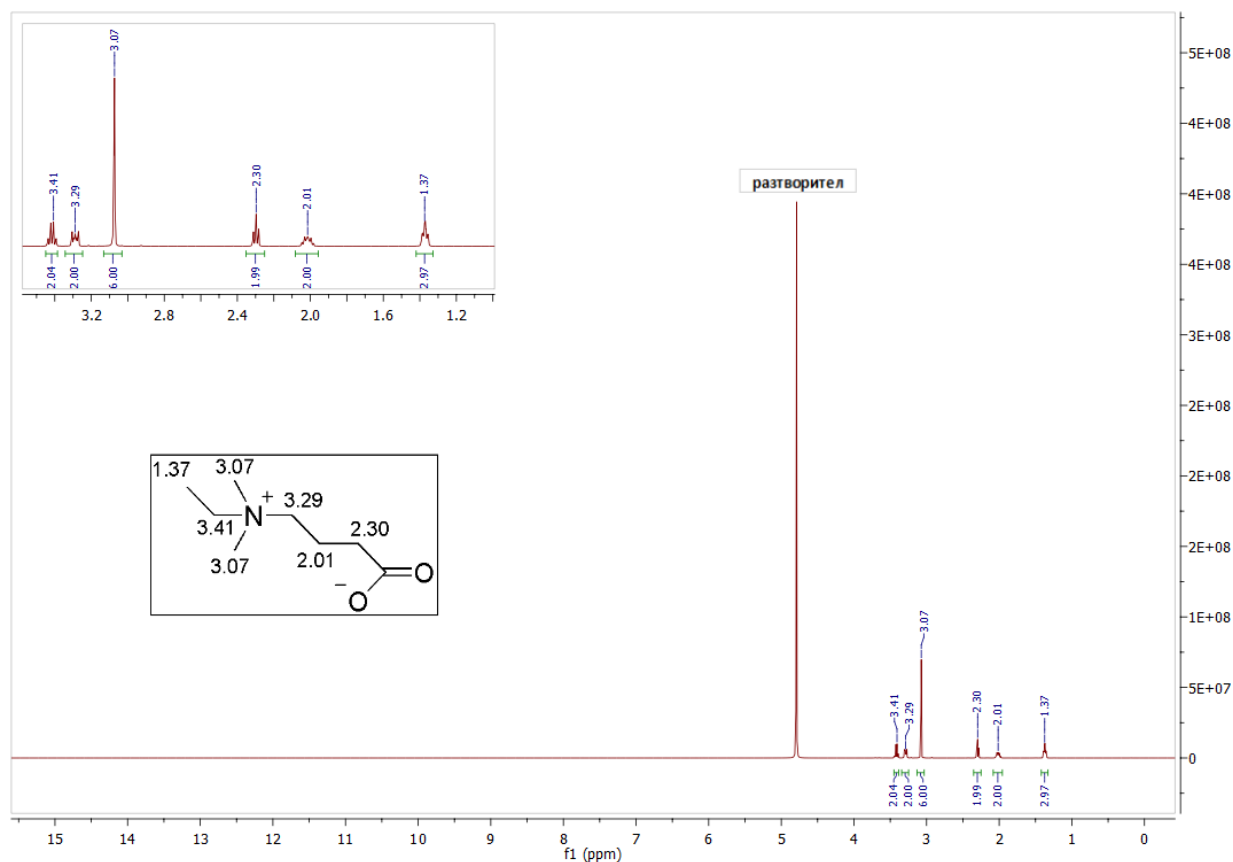
При провеждане на реакцията с алифатни амини и ароматните *N,N*-диметиламинопиридин и *N*-метилимидазол добивът е над 95%. Добивите за пиридин и изохинолин при същите реакционни условия, са значително по-ниски – под 50%, което може да се отдаде на понижената им нуклеофилност. С цел оптимизиране и повишаване добива на реакцията, получаването на съответните пиридин- и изохинолин-заместени естери, осъществихме при повишена температура 40-80 °C и за време от 7 дни. Тези промени доведоха до повишаване на добива до 65-75%.

Вторият етап от синтеза на целевите хетероциклени бетаини бе хидролиза на естерната група. С изключение на бетаина съдържащ изохинолинов фрагмент, останалите съединения бяха получени след хидролиза при престояване в силноосновна йоннообменна смола [Amberlite IRA-410(Cl)] в рамките на 1 ч. и третиране на хидролизиралите естери със силнокисела йоннообменна смола (Amberlite IR120 hydrogen form, strongly acidic) до неутрално рН. Получаването на 2-(4-етокси-4-оксобутил)изохинолин-2-ил бромид по описаната процедура не бе успешно, тъй като се наблюдаваше частична хидролиза (добив < 50%), както и наличие на странични продукти. Поради тези причини, 4-(изохинолин-2-ил) бутаноат синтезирахме чрез хидролиза в кисела среда с разреден разтвор на солна киселина (HCl). Излишъкът от киселината бе третиран с разреден разтвор на натриева основа (NaOH) до неутрално рН. Получените на този етап соли от натриев бромид (NaBr) и натриев хлорид (NaCl) превърнахме в малко разтворимите сребърни соли с добавяне на сребърен нитрат към разтвора до пълно утаяване от водната фаза. След филтруване на AgCl и AgBr, останалото количество от тях, както и допълнително получения NaNO_3 бяха отстранени чрез утаяване в подходящи органични разтворители.

Важно е да се отбележи, че реакцията с хинолин, както и с други хетероциклически съединения като оксазол и бензотиазол, води до получаването на сложни реакционни смеси, в резултат на което не успяхме да синтезираме тези съединения.

Получените съединения бяха охарактеризирани посредством ЯМР спектроскопия и HRMS спектрометрия. В литературата са налични данни за химичните отмествания в протонните и въглеродните ЯМР спектри за всички съединения с изключение на 4-(4-диметиламинопиридин-1-ил) бутаноат и 4-(изохинолин-2-ил) бутаноат [Szafran et al., 2001; Chevalier et al., 2016; Capela et al., 2019; Dega-Szafran & Przybylak, 1997; Kuroda et al., 2017; Tars et al., 2014]. Наблюдаваните от нас резултати за ЯМР спектрите на синтезираните съединения съвпадат с литературните данни. Характеристични сигнали в протонните спектъра на всички съединения са тези за бутановия фрагмент: мултиплет около 2,0 ppm, който съответства за протоните от метиленовата група в β -положение спрямо кватернерния азотен атом; триплет около 2,3 ppm, отговарящ на водородните атоми в метиленовата група в α -позиция спрямо карбоксилната или естерната група, и триплет в диапазона 3,0-3,5 ppm при алифатните бетаини и 3,5-4,0 ppm при ароматните, който

отговаря на метиленовата група в α -позиция спрямо кватернерния азотен атом. При 4-(изохинолин-2-ил) бутаноат и 4-(пиридин-1-ил) бутаноат сигналът е изместен след 4 ppm, което се обяснява с липсата на заместител с положителен мезомерен ефект в ароматното ядро и следователно по-голям частичен положителен заряд при въглеродния атом и съответно водородните атоми в тази метиленова група. За по-голяма яснота на дискусиата, на Фиг. 8 е представен спектъра на 4-(етилдиметиламониев) бутаноат (MeGBV).



Фигура 8. $^1\text{H-NMR}$ спектъра на 4-(етилдиметиламониев) бутаноат (MeGBV).

1.2.1. Синтез и охарактеризиране на серия изокумаринови производни

За получаване на серията от 3-алкилзаместени 3,4-дихидроизокумарин-4-карбоксилни киселини, както и техните 3-алкил- и 3-арил-6,7-диметоксизаместени аналози, използвахме метод, разработен от Bogdanov и Palamareva [Bogdanov & Palamareva, 2004] за синтез на аналози с ароматен или хетероароматен заместител на позиция 3 (Схема 4).

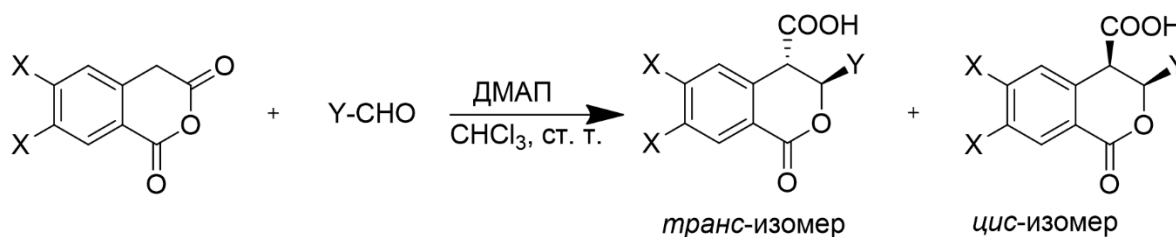


Схема 4. Синтез на 3,4-дихидроизокумарин-4-карбоксилни киселини и техните производни.

Методът се основава на взаимодействието на избран алдеhid с 6,7-диметоксихомофталов анхидрид в среда от сух хлороформ и ДМАП като катализатор при стайна температура, с последващо пречистване и изолиране на получените диастереоизомери чрез колонна хроматография. За разлика от друг екип от учени [Yu, 1999], който провежда реакцията в присъствие на Люисова киселина – $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ за 14 ч. с получаване на целевите диастереоизомери с добив ок. 80%, използваният от нас метод осигурява високи добиви (> 95%) при по-меки условия (ст. т.) и за по-кратки реакционни времена (1-2 ч.).

За синтеза на серията от 3-алкилзаместени 3,4-дихидроизокумарин-4-карбоксилни киселини и техните 6,7-диметокси заместени аналози, първата ни задача бе получаването на хомофталов и 6,7-диметоксихомофталов анхидрид. Синтезът на хомофталов анхидрид осъществихме чрез нагряване на търговски достъпна хомофталова киселина в среда от ацетилхлорид (Схема 5). Реакцията протича с високи добиви (> 90%), в рамките на 2 ч.

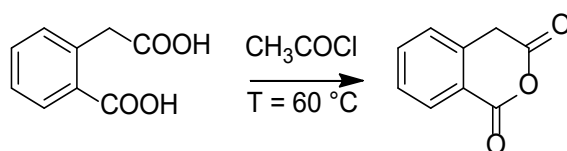


Схема 5. Синтез на хомофталов анхидрид от търговски достъпна хомофталова киселина.

Получаването на 6,7-диметоксихомофталов анхидрид извършихме посредством тристадийна реакционна схема. Първият етап е разновидност на окса-Пиктет-Шпенглер реакция [Larghi & Kaufman, 2006] и се състои във взаимодействие на 3,4-диметоксифенилоцетна киселина с формалдеhid, в среда от ледена оцетна киселина и концентрирана солна киселина при нагряване. След разработване на реакцията бе изолиран и охарактеризиран и страничен продукт на димеризация (Схема 6).

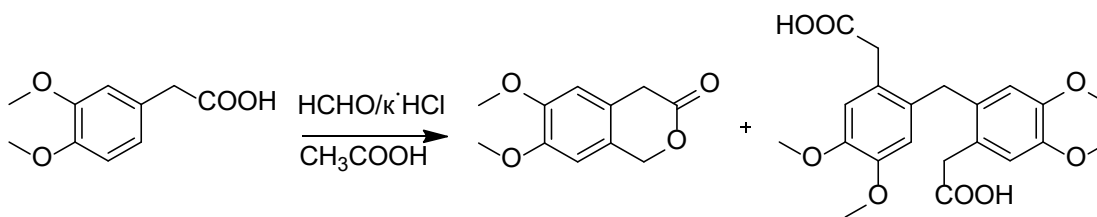


Схема 6. Взаимодействието на 3,4-диметокси-фенилоцетна киселина по окса-Пиктет-Шпенглер води до получаването на целевия лактон и страничен продукт на димеризация.

Реакционната смес бе пречистена от нереагиралата 3,4-диметоксифенилоцетна киселина и образувания димер чрез промиване с 5% разтвор на NaHCO₃, а целевият продукт бе изолиран слез прекристализация из етил ацетат с високи добиви (> 80%).

Вторият етап е на хидролиза на получения лактон със силна основа и последващо окисление с KMnO₄. Реакцията протича с изолиране на 2-карбоксиметил-4,5-диметоксибензоена киселина с високи добиви (> 75%). Получената киселина обработихме с ацетилхлорид при нагряване за 2 ч. и крайният продукт – 6,7-диметоксихомофталов анхидрид, бе изолиран с добив > 90%.

Синтезът на серията от 3-заместени 3,4-дихидроизокумарин-4-карбоксилни киселини и техните 6,7-диметокси заместени аналози бе осъществен съгласно Схема 4. Всички реакции проведохме при еднакви условия с използване на сух хлороформ като разтворител, 1,1 екв. хомофталов/6,7-диметоксихомофталов анхидрид, 1 екв. алдехид и 1 екв. ДМАП като катализатор при стайна температура и непрекъснато разбъркване. Краят на реакциите бе установен посредством тънкослойна хроматография. Получените диастереоизомерни смеси бяха разделени чрез колонна хроматография, подвижна фаза: петролев етер/етил ацетат = 3/2, а чистите продукти бяха прекристализирани из подходящ разтворител. Добивите след прекристализация за всички реакции са в интервала 55-95%.

Взаимодействието между хомофталовите анхидриди и алифатните алдехиди най-вероятно протича като нуклеофилно присъединяване на анхидрида към карбонилния въглероден атом от алдехида, с последваща лактонизация до получаването на дихидроизокумариновия скелет (Схема 7). В хода на реакцията се формират два нови стереогенни центъра при атомите С-3 и С-4, което обуславя наличието на σ -диастереомерия при този вид съединения, а от там и *цис*- и *транс*- разположение на заместителите при тези атоми по отношение на бензопираноновата пръстенна система. В първия етап, под действие

на катализатора (ДМАП), анхидридите преминават в енолатна форма, която след това атакува електрофилния център в алдехида. В следващия етап, протича вътрешномолекулярна циклизация посредством нуклеофилна атака към анхидридният пръстен, с получаване на целевите 3,4-дизаместени 3,4-дихидроизокумарини с два нови стереогенни центъра в структурата им.

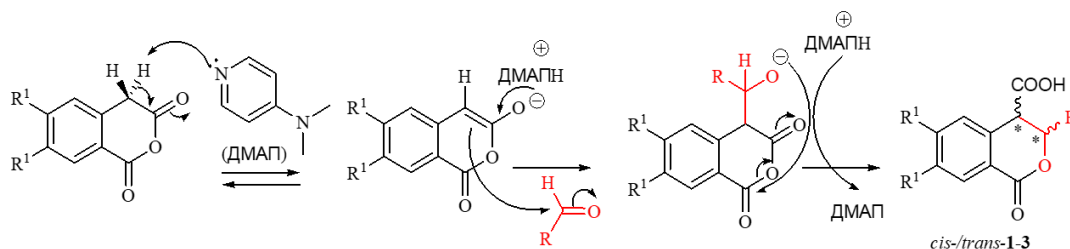
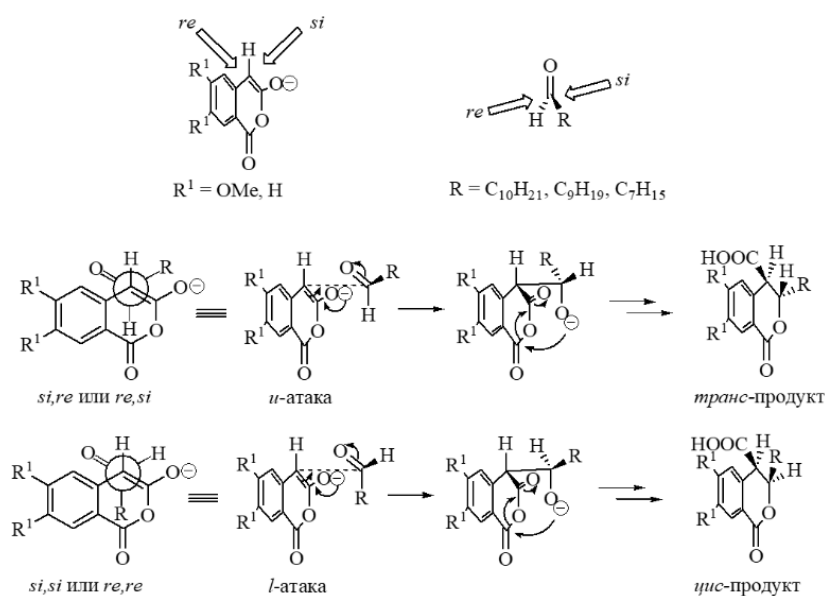


Схема 7. Механизъм на взаимодействието между хомофталови анхидриди и 6,7-диметоксихомофталови анхидриди и алдехиди в присъствие на *N,N*-диметиламинопиридин (ДМАП).

При провеждане на реакцията с базичен катализатор, активната нуклеофилна частица е енолатната форма на депротонираните хомофталови анхидриди (Схема 7). В този случай благоприятната ориентация на енолата и алдехида е с антиперипланарно разположение на двата кислородни атома, като предпочетено се реализира *u*-атака, т.е. взаимодействие на *re* със *si* или *si* с *re* лица, водеща до продукта с *транс*-конфигурация (Фиг. 9). *l*-Атаката е енергетично по-неизгодна, поради пространствената близост на алкиловия заместител от алдехида и ароматното ядро от анхидрида, водеща до стерично пречене.



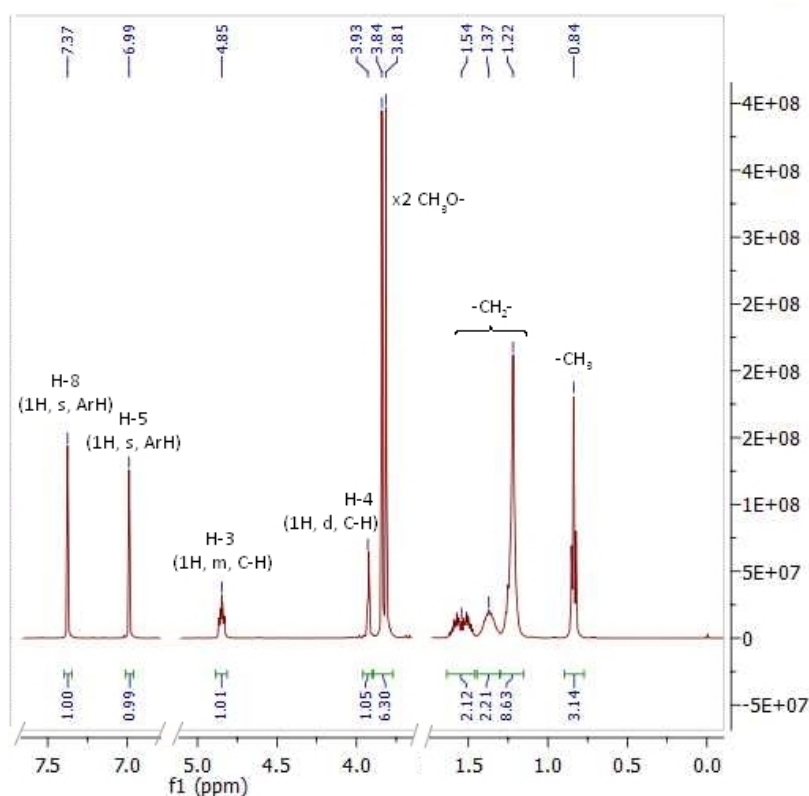
Фигура 9. Осъществяване на *l*- и *u*-атака при взаимодействие между хомофталови анхидриди и алдехиди.

От предишни изследвания в групата се знае, че в случаите когато се използват ароматни алдехиди, диастереомерното съотношение *транс/цис* е в интервала 2,5-4 в полза на *транс*-изомерите [Bogdanov & Palamareva, 2004], което бе потвърдено и при осъществения от нас синтез на 3-арилзаместени продукти. При използването на алифатни алдехиди, във всички случаи бе наблюдавано отношение *транс/цис* от 1.5. Наблюдаваното понижаване на *транс*-диастереоселективността на реакцията може да бъде обяснено с по-малкия ефективен обем на алкиловия спрямо ариловия заместител. В резултат на това се понижава и енергията на преходното състояние при *l*-атаката, поради намаленото стерично пречене между анхидрида и алдехида, като се повишава вероятността за нейното реализиране.

Всички 3,4-дихидроизокумаринови производни бяха изолирани под формата на двата възможни изомера – *цис* и *транс*. Изключение са 3-пропил-3,4-дихидроизокумарин-4-карбоксилната киселина и 6,7-диметокси заместения ѝ аналог. 3-Пропил-3,4-дихидроизокумарин-4-карбоксилната киселина бе изолирана като две смеси – *m1*- и *m2*- с процентно съдържание на *цис*-изомера съответно 65% и 40%. 6,7-Диметокси-3-пропил-3,4-дихидроизокумарин-4-карбоксилната киселина бе получена като две смеси – *m1*- и *m2*- с процентно съдържание на *цис*-изомера съответно 85% и 30%. *цис*-Изомерът на 3-(2,5-диметоксифенил)-6,7-диметокси-3-пропил-3,4-дихидроизокумарин-4-карбоксилната киселина бе успешно изолиран, но *транс*-изомерът бе получен под формата на смес със съотношение *цис/транс* = 60/40.

Структурата на новосинтезираните 3-алкилзаместени аналози бе еднозначно определена с помощта на различни спектрални техники, включително ^1H , ^{13}C , DEPT-135 ЯМР и HRMS анализ. Интерпретацията на спектралните данни е в съответствие със съществуващите в литературата [Bogdanov & Palamareva, 2004; Miliovski et al., 2013; Miliovski et al., 2015]. В протонните спектри за всички съединенията фигурират характеристични сигнали, независимо от конфигурацията или използвания разтворител. За 6,7-диметоксизаместените аналози те включват два синглета за ароматните протони H-8 и H-5, два синглета за метокси групите и мултиплетни сигнали за метиловите и метиленовите групи в алкиловата верига при C-3. Допълнителни сигнали, отразяващи разликите в конфигурацията и позволяващи определянето на веществата като *цис*- и *транс*-диастереомери са ясно различими мултиплетни за H-3 и дублети за H-4. За по-голяма яснота,

на Фигура 10 е представен протонен ЯМР спектър на *транс*-diOMe-iC7 в DMSO-d₆, с обозначени протони.



Фигура 10. ¹H-спектър на *транс*-3-хептил-6,7-диметокси-3,4-дихидроизокумарин-4-карбоксилната киселина (*транс*-diOMe-iC7).

За конфигурацията на *цис* и *транс* диастереомерите за 3,4-дизаместените 3,4-дихидроизокумарини може да се съди от стойността на вициналните константи на спин-спиново взаимодействие ($^3J_{3,4}$) между H-3 и H-4, наблюдавани в протонните ЯМР спектри. Като правило, $^3J_{3,4}$ в диапазона 3-6 Hz са характерни за *цис* конфигурация със синклинална (*sc* или *gauche*) ориентация на протоните, докато тези в диапазона 10-13 Hz предполагат *транс* конфигурация с антиперипланарна (*ap* или *транс*) ориентация (вж. Фигура 11). Важно е да се отбележи, че и двата диастереомера са конформационно подвижни и могат да съществуват като смес от конформери, като някои от тях може да са предпочетени поради пространствени, електронни или солватационни ефекти. Конформационната подвижност е фактор от голямо значение, тъй като предпочитаните конформации определят свойствата на дадено съединение. Например, те биха могли да повлияят на физикохимичните характеристики, реактивоспособността и взаимодействията с други

молекули, като напр. ензими (виж Фиг. 7). Освен това, negliжирането на конформационната подвижност като фактор, може да доведе до определяне на грешна конфигурация на изолиран или синтезиран единичен диастереомер.

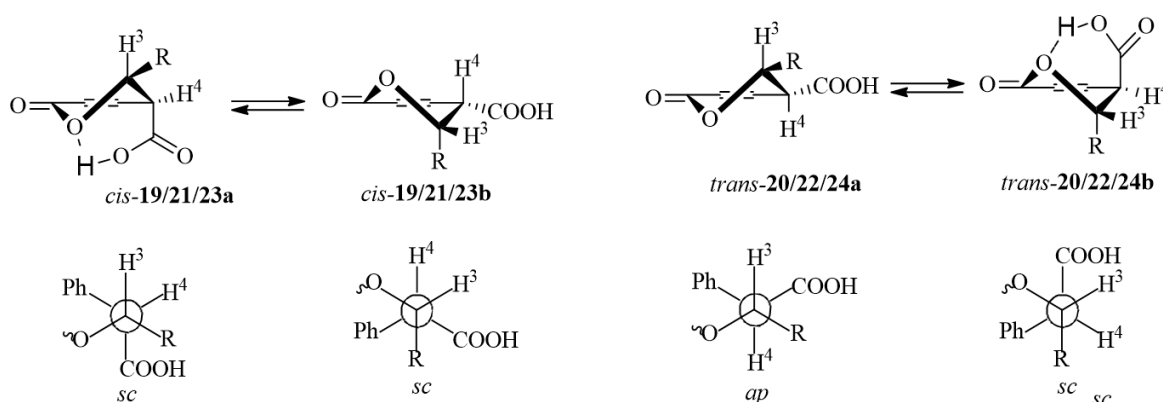
Синтезираните от нас 3-алкилзаместени-3,4-дихидроизокумарин-4-карбоксилни киселини представляват изключително подходящ обект за изследването на описания феномен. В Таблица 4 са представени избрани ЯМР параметри за три диастереомерни двойки с алкилови заместители на 3-то място в бензопираноновата пръстенна система – хептил, нонил, децил.

Съединение	Химично отместване (ppm), мултиплетност и константи на купелуване (Hz)									
	H-8, s		H-5, s		H-4, d		H-3, m*		$^3J_{3,4}$	
	CDCl ₃	DMSO	CDCl ₃	DMSO	CDCl ₃	DMSO	CDCl ₃	DMSO	CDCl ₃	DMSO
<i>цис</i> -diOMe-C7(19)	7.57	7.39	6.73	7.02	3.78	3.86	4.59 (4.62-4.57)	4.62 (4.65-4.58)	3.2	3.3
<i>цис</i> -diOMe-C9(21)	7.58	7.39	6.73	7.02	3.73	3.85	4.59 (4.61- 4.56)	4.61 (4.66-4.56)	3.0	3.3
<i>цис</i> -diOMe-C10(23)	7.58	7.38	6.73	7.02	3.73	3.86	4.58 (4.60-4.55)	4.61 (4.66-4.55)	3.2	3.3
Average (<i>цис</i>)	7.58	7.39	6.73	7.02	3.75	3.86	4.59	4.61	3.1	3.3
<i>транс</i> -diOMe-C7(20)	7.57	7.37	6.73	6.99	3.74	3.93	4.91 (4.95-4.87)	4.85 (4.88-4.81)	4.4	3.3
<i>транс</i> -diOMe-C9(22)	7.57	7.38	6.73	6.99	3.78	3.92	4.91 (4.94-4.88)	4.85 (4.89-4.80)	4.5	3.3
<i>транс</i> -diOMe-C10(24)	7.58	7.37	6.73	6.99	3.78	3.92	4.92 (4.95-4.88)	4.84 (4.89-4.79)	4.5	3.3
Average (<i>транс</i>)	7.57	7.37	6.73	6.99	3.77	3.92	4.91	4.85	4.5	3.3
Δδ	0.01	0.02	na	0.03	0.02	0.06	0.32	0.24	1.4	na

Таблица 4. ¹H ЯМР – параметри на *цис*- и *транс*-изомерите на съединения **19-24** при стайна температура в различни разтворители. * Даден е центърът на мултиплета и диапазонът в скоби; n.a.—не е приложимо.

За да определим коректно съответните конфигурации, ние се позовахме на експериментално установени зависимости. Първо, базично-катализираните реакции на хомофталови анхидриди с алдехиди са с доказана *транс*-дистереоселктивност [Bogdanov & Palamareva, 2004]. Второ, химичните отмествания на протоните H-3 и H-4 в *транс* изомерите са изместени в по-слабо поле в сравнение с тези в *цис* изомерите (Таблица 4). Трето, константите $^3J_{3,4}$ в *транс* изомерите варират в зависимост от полярността на разтворителя [Bogdanov et al., 2004]. Първите две зависимости са валидни за спектрите снети в DMSO-d₆, но третата е неприложима, поради демонстрираната и от двата диастереомера еднаква стойност за $^3J_{3,4} = 3.3$ Hz. За да присвоим недвусмислено конфигурациите на синтезираните съединения, снимахме спектри и в CDCl₃ като разтворител. Както се вижда от Таблица 4, промяната в разтворителя почти не повлиява $^3J_{3,4}$ за *цис* изомера, но оказва значително

влияние на *транс*, променяйки съответните константи от 3,3 Hz в DMSO-d6 до 4,5 Hz в CDCl₃. За да обясним тези резултати, проведохме дедуктивен конформационен анализ. За по-голяма яснота на дискусиата, двете най-предпочитани конформации на изохроманоновия пръстен за двата диастереомера са представени в перспектива и като Нюмънови проекции по връзката C3-C4 на Фигура 11. Уравнението на Карплъс [Karplus, 1959; Karplus, 1963], предполага ${}^3J_{3,4}$ за *цис* изомерите в диапазона 3-6 Hz, независимо от конформацията (диедричен ъгъл H3-C3-C4-H4 от 60° и в двете конформации), докато при *транс* изомерите те могат да варират от 3-6 Hz до 10-13 Hz (60° за *транс*-**20/22/24b** и 180° за *транс*-**20/22/24a**, съответно).

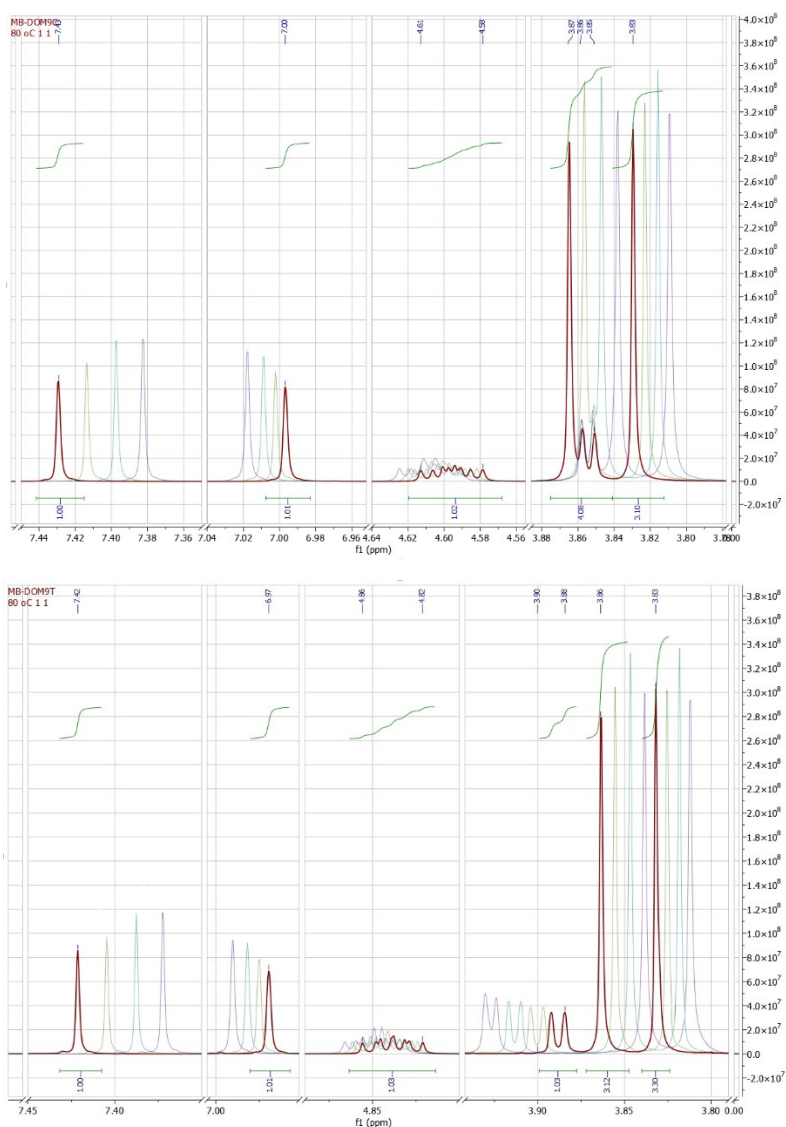


Фигура 11. Предпочетени конформации в бензопираноновата пръстенна система на съед. **19-24**.

Анализът на данните позволява да се направи заключение, че конформационното равновесие за *транс* изомерите е изместено към конформерите *транс*-**20/22/24b**, независимо от използвания разтворител (${}^3J_{3,4}$ в интервала 3-6 Hz), но промяната в наблюдаваните константи на купелуване с промяна на разтворителя позволява да се припише *транс* конфигурация с предпочетената конформация с аксиални и псевдоаксиални заместители при C-3 и C-4, съответно. Това предпочитание може да се обясни с отсъствието на пространствено пречене между алкиловия заместител и карбоксилната група в тази конформация. Въпреки че това се различава донякъде от установените тенденции в циклохексановите системи, това заключение може да бъде свързано с наличието на три sp^2 въглеродни атома в пръстенната структура, което елиминира възможността за 1,3-диаксиални взаимодействия и благоприятства

антиперипланарната конформация на по-обемистите заместители. В допълнение, вътрешномолекулна водородна връзка между карбоксилната група и кислородния атом на лактона (Фиг. 11) може също да допринася за тази конформация, както и за конформацията *цис*-**19/21/23a** за *цис* изомера.

За да оценим по-пълно поведението на изследваните съединения, ние проведохме допълнителни ЯМР анализи за една диастереомерна двойка (*цис*-/*транс*-diOMe-iC9) при различни температури: 20, 40, 60 и 80 °C. Резултатите са представени на Фигура 12.



Фигура 12. Подредени ^1H ЯМР спектри на *транс*-diOMe-iC9 (горе) и *цис*- diOMe-iC9 (долу) в DMSO-d₆ при различни температури: 80 °C (червено); 60 °C (зелен); 40 °C (синьо); 20 °C (лилаво).

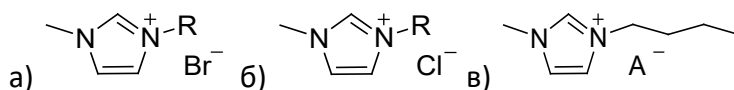
Както се вижда, повишаването на температурата довежда до сходни промени в химичните отмествания на характерните сигнали за двата изомера, което води до общ модел за сигналите, независими от конфигурацията (H-5, H-8 и двете метокси групи), както и – което е интересно – за H-3. Сигналът на H-4 обаче, показва значителни разлики: при *цис*-изомера той е температурно независим и запазва непроменено химично отместване, докато при *транс*-изомера се измества към по-силно поле с повишаване на температурата. Освен това, константата на спин-спиново взаимодействие остава непроменена за *цис*-изомера (3,3 Hz), но се увеличава с 0,2 Hz на всеки 20 °C за *транс*-изомера, променяйки се от 3,3 Hz при 20 °C до 3,9 Hz при 80 °C. Тези резултати съответстват на направените по-рано заключения и подкрепят идеята, че външните фактори, влияещи върху конформацията на съединението, могат да бъдат полезен инструмент за определяне на конфигурацията на неизвестно вещество. Въпреки това, този подход е приложим само за съединения, които могат да заемат конформации с различни и ясно различими свойства.

1.2.3. Синтез и охарактеризиране на серия йонни течности

За установяване ефекта на йонните течности върху активността на карнитин ацетилтрансфераза и с цел изясняване връзките структура – активност, ние синтезирахме три групи ЙТ. Като основен структурен фрагмент бе избран най-широко използваният *N*-метилимидазолиев йон $\{[RC_{1im}]^+\}$. Групите ЙТ могат да се класифицират по следния начин:

- 1) ЙТ с вариращ заместител при N3 в състава на *N*-метилимидазолиевия йон и бромид като анион – $[C_nC_{1im}]Br$, Фиг. 13а, Таблица 5;
- 2) ЙТ с неразклонена въглеродна верига (C4-C10) като заместител на N3 в състава на *N*-метилимидазолиевия йон и хлорид като анион – $[C_nC_{1im}]Cl$, Фиг. 13б, Таблица 5;
- 3) ЙТ с 1-бутил-3-метилимидазолиев катион с вариращ анион – $[C_4C_{1im}]A$, Фиг. 13в, Таблица 5.

Всички съединения от първата група, с изключение на $[HC_{1im}]Br$, бяха синтезирани чрез реакция на кватернизация между *N*-метилимидазол (C_{1im}) и съответния алкилбромид. Реакциите протичат в рамките на една седмица в сух ацетонитрил и инертна атмосфера (азот) при 50 °C. $[HC_{1im}]Br$ бе получен чрез смесване на еквимоларни количества C_{1im} и конц. бромоводородна киселина и последваща обработка.



Фигура 13. Обща структура на синтезираните йонни течности на база *N*-метилимидазолиевия йон с: а) вариращ заместител при N3 и бромиден анион, б) неразклонена въглеродна верига (C4-C10) при N3 и хлориден анион, в) 1-бутил-3-метилимидазолиев катион и вариращ анион.

Таблица 5. Използвана абривиатура и наименование на синтезираните ЙТ.

Абривиатура	Наименование	Абривиатура	Наименование
[C ₂ C ₁ im]Br	1-етил-3-метилимидазолиев бромид	[NCC ₃ C ₁ im]Br	1-метил-3-(3-цианопропил)-имидазолиев бромид
[C ₄ C ₁ im]Br	1-бутил-3-метилимидазолиев бромид	[C ₁ OC ₁ C ₁ im]Br	1-метил-3-(метоксиметил)-имидазолиев бромид
[C ₆ C ₁ im]Br	1-метил-3-хексилимидазолиев бромид	[C ₁ OC(O)C ₁ C ₁ im]Br	1-(2-метокси-2-оксоетил)-3-метилимидазолиев бромид
[C ₈ C ₁ im]Br	1-метил-3-октилимидазолиев бромид	[C ₁ OC(O)C ₂ C ₁ im]Br	1-(3-метокси-3-оксопропил)-3-метилимидазолиев бромид
[C ₁₀ C ₁ im]Br	1-децил-3-метил-имидазолиев бромид	[<i>sec</i> -C ₄ C ₁ im]Br	1-метил-3-(1-метил-2-оксоетил)имидазолиев бромид
[PhC ₁ C ₁ im]Br	1-бензил-3-метил-имидазолиев бромид	[HC ₁ im]Br	<i>N</i> -метилимидазол хидробромид
[PhC ₂ C ₁ im]Br	1-метил-3-(2-фенилетил)-имидазолиев бромид	[C ₄ C ₁ im]Cl	1-бутил-3-метилимидазолиев хлорид
[PhC ₃ C ₁ im]Br	1-метил-3-(3-фенилпропил)-имидазолиев бромид	[C ₆ C ₁ im]Cl	1-метил-3-хексилимидазолиев хлорид
[cC ₆ C ₁ C ₁ im]Br	1-метил-3-(циклохексил-метил)имидазолиев бромид	[C ₈ C ₁ im]Cl	1-метил-3-октилимидазолиев хлорид
[cC ₆ C ₂ C ₁ im]Br	1-метил-3-(2-циклохексилетил)-имидазолиев бромид	[C ₁₀ C ₁ im] Cl	1-децил-3-метилимидазолиев хлорид
[AllylC ₁ im]Br	1-алил-3-метилимидазолиев бромид	[C ₄ C ₁ im]SCN	1-бутил-3-метилимидазолиев тиоцианат
[<i>i</i> -C ₄ C ₁ im]Br	1-изобутил-3-метилимидазолиев бромид	[C ₄ C ₁ im]Ac	1-бутил-3-метилимидазолиев ацетат
[<i>i</i> -C ₅ C ₁ im]Br	1-изопентил-3-метилимидазолиев бромид	[C ₄ C ₁ im]N(CN) ₂	1-бутил-3-метилимидазолиев дистицианамид
[HOCC ₃ C ₁ im]Br	1-метил-3-(3-хидроксипропил)-имидазолиев бромид	[C ₄ C ₁ im]TFA	1-бутил-3-метилимидазолиев трифлуороацетат

Добивите за синтезираните ЙТ със заместител неразклонен алкилов остатък – [C₂C₁im]Br, [C₄C₁im]Br, [C₆C₁im]Br, [C₈C₁im]Br и [C₁₀C₁im]Br бяха над 95%. Високата степен на протичане на реакцията с нормални 1-бромоалкани е очаквана, поради предполагаемия механизъм

на реакцията – бимолекулно нуклеофилно заместване (S_N2) и използването на първични алкилбромиди, при които липсва пространствено пречене. Синтезът на ЙТ с разклонена въглеводородна верига като заместител при $N3$ протичат със значително по-ниски добиви. Йонната течност $[i-C_4C_{1im}]Br$, продукт на взаимодействието на изобутилбромид и C_{1im} , е получена с добив 40% при същите условия, а $[i-C_5C_{1im}]Br$ с добив от 80% от 1-бromo-3-метилбутан и C_{1im} . Причината за по-ниския добив при $[i-C_4C_{1im}]Br$ е наличието на метилова група в α -позиция спрямо въглеродния атом свързан с бром в структурата на изобутилбромида, която води до пространствено пречене при атака на нуклеофила в условията на S_N2 реакция. При изопентилбромида този ефект е по-слабо изразен, тъй като обемистият заместител е на β -позиция. Въпреки това, наличието на метиловата група оказва влияние върху добивите, които са с почти 20% по-ниски в сравнение с тези на неразклонените алифатни алкилбромиди. В процеса на работа бяха проведени експерименти и за получаване на ЙТ от C_{1im} и *втор*-бутилбромид, и C_{1im} и *трет*-бутилбромид, но като основен продукт бе изолиран протониран *N*-метилимидазол – $[HC_{1im}]Br$. При реакцията с *втор*-бутилбромид бе изолирана смес от продукти – $[HC_{1im}]Br$ и $[sec-C_4C_{1im}]Br$ в съотношение 9:1. Най-вероятно, в хода на тези реакции протича преимуществено процес на елиминиране, с получаване на $[HC_{1im}]Br$ и съответния алкен или смес от алкени.

Аналогични бяха и резултатите при използване на първични алкилбромиди, съдържащи циклохексиллов заместител в структурата си. Йонната течност – $[cC_6C_2C_{1im}]Br$, продукт на взаимодействието на C_{1im} с (2-бромоетил)циклохексан, е изолирана с добив 94%. Реакцията между C_{1im} и (бромометил)циклохексан води до получаването на $[cC_6C_1C_{1im}]Br$ с добив 40%, докато при използване на бромциклохексан, формиране на съответната ЙТ – $[cC_6C_{1im}]Br$, не бе наблюдавано. Наличието на обемист заместител в α -положение спрямо въглеродния атом свързан с бром – циклохексиллов фрагмент, намалява значително степента на протичане на реакцията – с почти 50%.

Йонни течности с наличие на фрагмент от бензеново ядро – $[PhC_1C_{1im}]Br$, $[PhC_2C_{1im}]Br$ и $[PhC_3C_{1im}]Br$, бяха изолирани с високи добиви (> 97%). Аналогично на (2-бромоетил)циклохексан, наличието на заместител в β - или γ -положение спрямо бромния атом в структурата на (2-бромоетил)бензен и (3-бромопропил)бензен не оказват

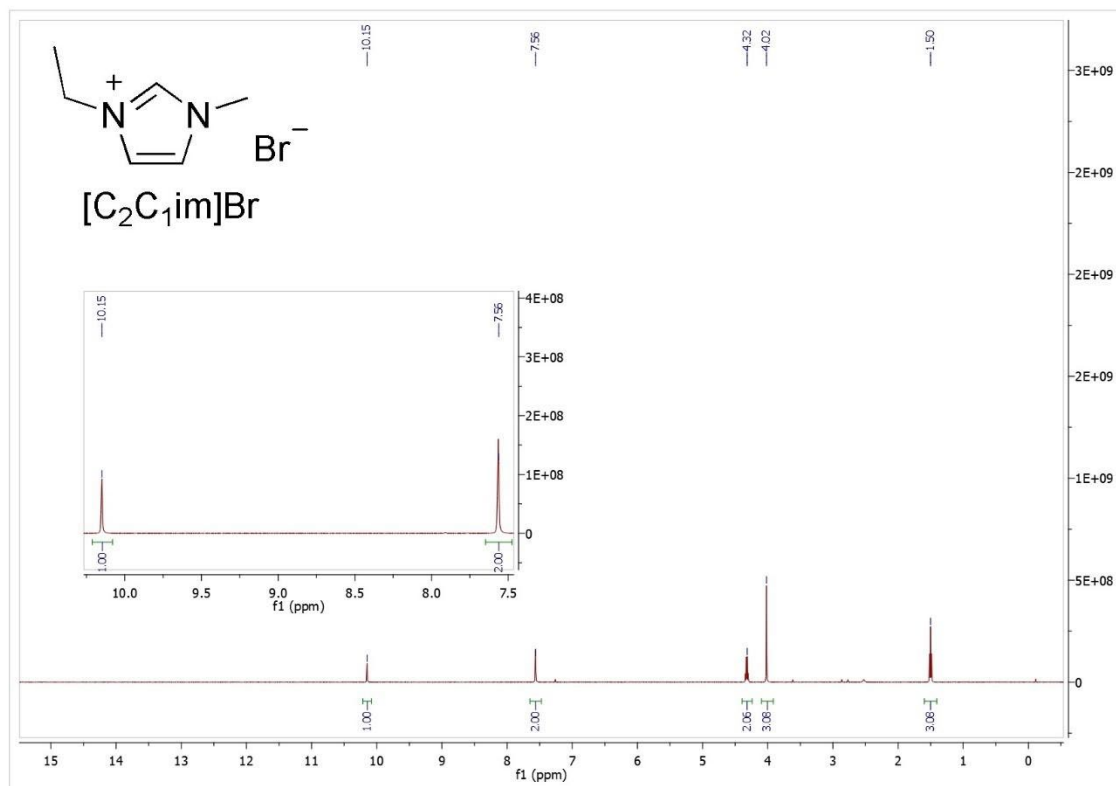
значително влияние върху реакцията на алкилбромида с C_{1im} и не се наблюдава образуване на странични продукти. Наличието на спрегната система в бензилбромида, насочва реакцията да протече като мономолекулно нуклеofilно заместване – S_N1 , което от своя страна води до почти пълно превръщане на реагентите в желанния продукт, за разлика от реакцията проведена с алифатния аналог (бромометил)циклохексан. По подобен механизъм протича и реакцията между 3-бромпропен (алилбромид) и C_{1im} , като в този случай ЙТ $[AllylC_{1im}]Br$ е получена като единствен продукт на реакцията с добив 99%.

Въвеждането на полярна група като нитрилна ($-CN$) в трета позиция на 1-бромпропан не оказва влияние върху степента на протичане на заместителната реакция – $[NCC_3C_{1im}]Br$ е изолиран като единствен продукт с добив 94%. Заместването на нитрилната група с хидроксилна обаче, намалява значително реактивоспособността и $[HOC_3C_{1im}]Br$ се получава с добив от 30%. Синтезът на $[C_1O(CO)C_1C_{1im}]Br$ и $[C_1OC_1C_{1im}]Br$ бе проведен успешно с добиви над 90%. Получаването на $[C_1O(CO)C_2C_{1im}]Br$ бе затруднено и целевият продукт бе изолиран като смес с $[HC_{1im}]Br$ в съотношение 1:1. Най-вероятната причина за ниския добив е протичането на конкурентен процес на елиминиране с получаване на метил акрилат.

Поради по-ниската реактивоспособност на алкилхлоридите, ЙТ от втората целева група бяха синтезирани съгласно описаната по-горе процедура, но в среда от *N,N*-диметилформаид при 100 °C. Получените йонни течности: $[C_4C_{1im}]Cl$, $[C_6C_{1im}]Cl$, $[C_8C_{1im}]Cl$ и $[C_{10}C_{1im}]Cl$, бяха изолирани с добиви > 90% и охарактеризирани посредством ЯМР-спектроскопия.

Съединенията от третата група – ЙТ с 1-бутил-3-метилимидазолиев катион и вариращ анион $[C_4C_{1im}]A$: $[C_4C_{1im}]SCN$, $[C_4C_{1im}]Ac$, $[C_4C_{1im}]N(CN)_2$ и $[C_4C_{1im}]TFA$, са търговски достъпни и бяха използвани за целите на *in vitro* изследвания без допълнителна обработка.

Всички бяха охарактеризирани посредством ЯМР спектроскопия. Общи за спектъра на всички съединения са синглет около 10 ppm, и мултиплет около 7,5 ppm, съответстващи на протоните свързани с C2, C4 и C5 въглеродни атоми, както и синглет за *N*-метиловата група в структурата на *N*-метилимидазолиевия фрагмент. На Фигура 14 е представен 1H -ЯМР спектър на $[C_2C_{1im}]Br$.



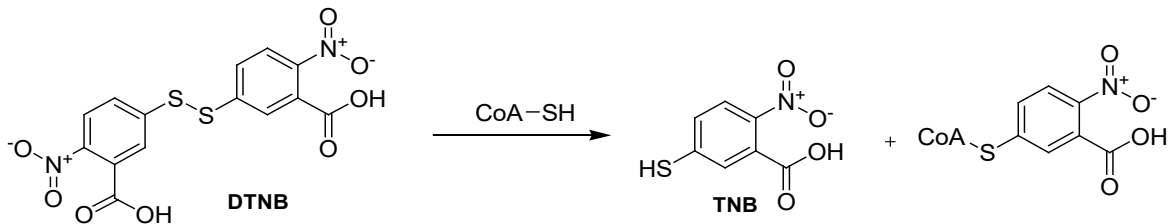
Фигура 14. ^1H -спектър на 1-етил-3-метилимидазолиев бромид, $[\text{C}_2\text{C}_1\text{im}]\text{Br}$.

В резултат на проведените синтези са получени, изолирани и охарактеризирани 10 производни на гама-бутановата киселина, 11 диастереомерни двойки 3,4-дизаместени-3,4-дихидроизокумарини и 24 йонни течности. Получените съединения са изследвани за инхибиторната им способност по отношение на *CrAT*, както е описано в следващата точка.

1.3. *In vitro* изследвания

За оценяване ефекта на синтезираните съединения върху активността на *CrAT* и извеждане на връзката структура – активност бе определена концентрацията, необходима за понижаване на активността на ензима с 50% (IC_{50}) при еднакви реакционни условия, и сравняване със стойностите за положителните контроли Мелдониум и MeGBV. За целта бе използвана процедура, първо описана от Marquis и Fritz [Marquis & Fritz, 1964; Galan et al., 1998], с няколко модификации по отношение на концентрацията на субстрата и реакционното време. Методът определя индиректно степента на превръщане на L-карнитин в ацетил L-карнитин, като в основата му е реакцията между 5,5'-дитиобис-(2-нитробензоена киселина), **DTNB** или реактив на Елман, със свободната тиолна група от CoA

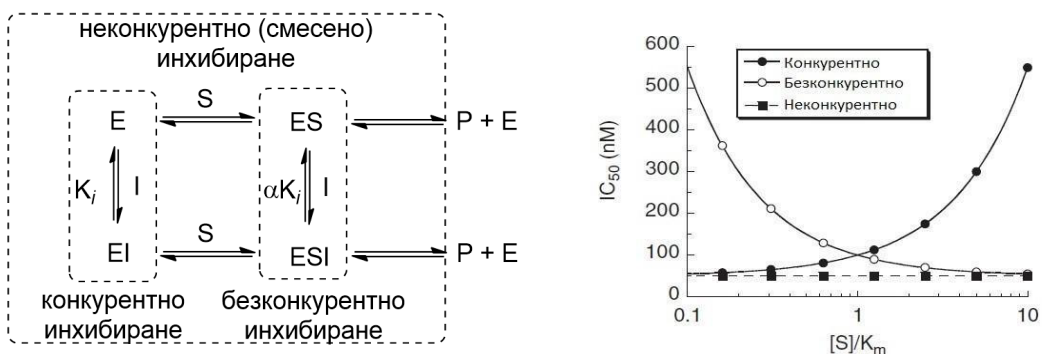
и следващо спектрофотометрично определяне на получената 2-нитро-5-тиобензоена киселина (**TNB**, Фигура 15). В слабо алкална среда (pH 7,5-8,6), **TNB** се депротонира до 2-нитро-5-тиобензоат (**TNB⁻**) с максимум на поглъщане в УВ-областта при $\lambda_{\max} = 412 \text{ nm}$ и моларен екстинционен коефициент $\epsilon = 14\,150 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Отчитане промяната в абсорбцията при посочената дължина на вълната (останалите компоненти на реакцията и матрицата не абсорбират при $\lambda = 412 \text{ nm}$) позволява количественото определяне на получения CoA, който съответства на количеството превърнат L-карнитин.



Фигура 15. Взаимодействието на CoA и реактив на Елман (**DTNB**).

1.3.1. Определяне на инхибираща активност

IC_{50} е концентрацията на инхибитора, която води до намаляване на активността на ензима с 50%. За разлика от K_m и V_{\max} , които са характеристични за ензима и тяхната стойност зависи единствено от температурата, природата на ензима и субстрата (при V_{\max} и от концентрацията на ензима), IC_{50} е зависима и от концентрацията на субстрата, както е показано на Фигура 16 за различните типове инхибиране.



Фигура 16. Промяна в стойностите на IC_{50} с промяна концентрацията на субстрата $\{[S]\}$ при различни механизми на инхибиране. K_m – константа на Михаелис-Ментен за неинхибираня ензим.

При конкурентно инхибиране, с увеличаване концентрацията на субстрата – [S], се увеличава вероятността за образуване на ензим-субстратен комплекс, което изисква по-високи концентрации на инхибитора за постигане на една и съща степен на инхибиране, а при безконкурентно инхибиране се наблюдава обратната зависимост, т.е. IC_{50} намалява с увеличаване на [S], съгласно принципа на Льо Шателие-Браун. При неконкурентното (смесено) инхибиране инхибиторът се свързва с еднакъв афинитет ($K_i = \alpha K_i$, $\alpha = 1$) както със свободния ензим, така и с ензим-субстратния комплекс, и по тази причина, промяната в концентрацията на субстрата не оказва влияние върху стойностите на IC_{50} . За да се получат сравними резултати за съединения с непознат механизъм на действие е най-подходящо определянето на IC_{50} да се извършва при концентрация на субстрата близка или равна на K_m . По този начин се минимизира ефектът на [S] върху IC_{50} за инхибитори с различен механизъм на действие.

За един от използваните от нас положителни контроли – Мелдониум, е установено конкурентен тип инхибиране на CrAT [Jaudzems et al., 2009]. Поради сходство в структурата на синтезираните от нас вещества със субстратите на реакцията, ние очакваме подобен механизъм на действие. За това при определянето на IC_{50} в настоящето изследване избрахме да работим при концентрация на субстрата осигуряваща отношение [S]/ K_m около 0,01 [с(L-карнитин) = 50,56 μ M и $K_m = 3,0$ mM], при което IC_{50} практически не зависи от [S].

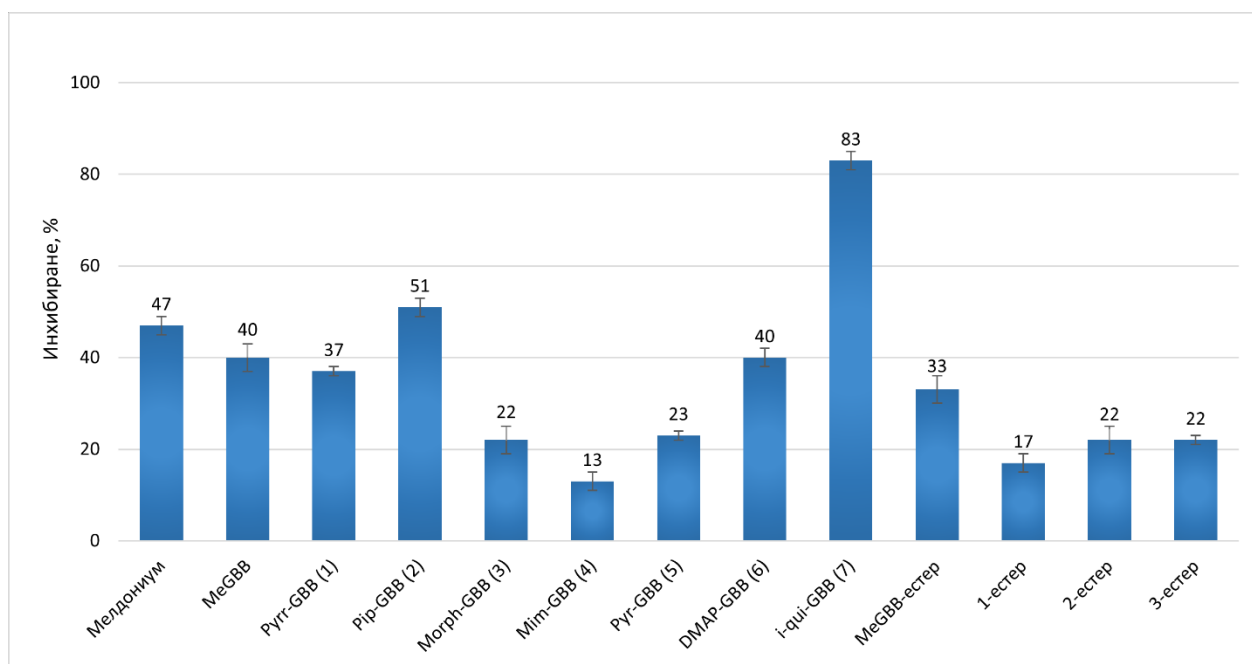
За количествена оценка на дадена ензимна реакция се използват основно два подхода – кинетичен и такъв, с отчитане на крайния момент на реакцията (end-point). За нашите цели избрахме кинетичния подход, т.е. измерване на скоростта на реакцията в интервал от време Δt , през който зависимостта е линейна (около 10-15% превръщане на субстрата). Времето за отчитане бе първата минута след началото на реакцията, а степента на инхибиране бе определена по следната формула:

$$\%Inh = 100 \times \frac{(\Delta A/\Delta t)_{\text{контрола}} - (\Delta A/\Delta t)_{\text{инхибитор}}}{(\Delta A/\Delta t)_{\text{контрола}}},$$

където „контрола“ отговаря за проба без инхибитор.

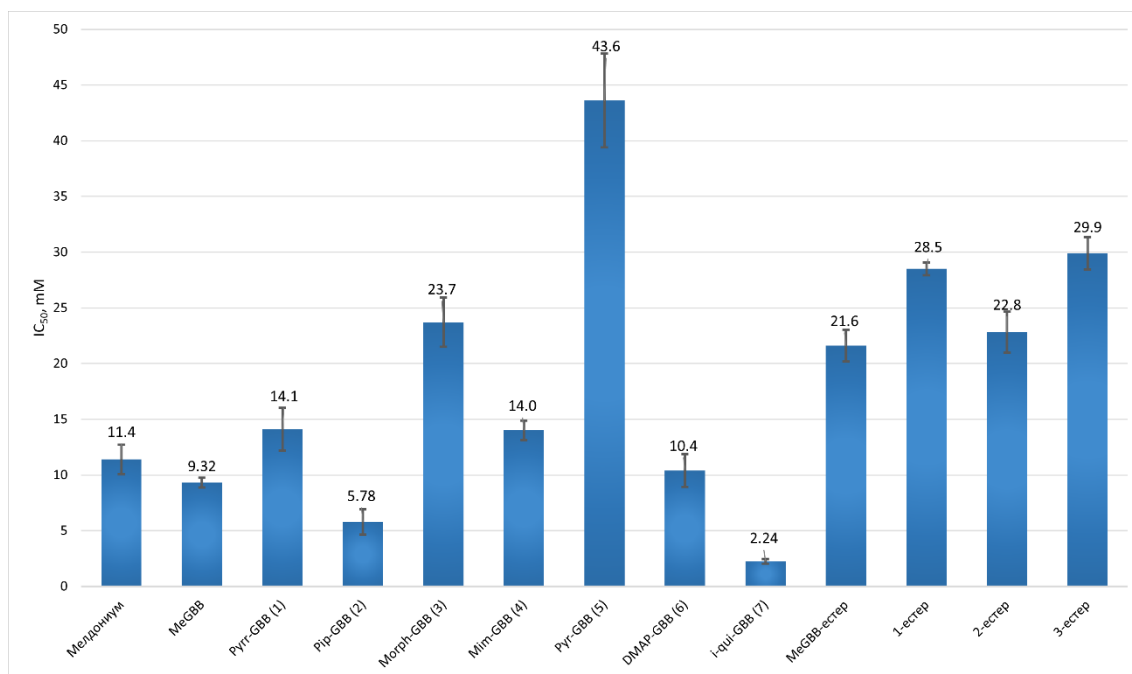
1.3.1.1. Определяне на IC_{50} на серия хетероциклени гама-бутиробетаини

С цел ориентировъчна оценка на инхибиращата способност за синтезираните съединения проведохме предварителни изследвания при еднаква концентрация на инхибиторите. Получените резултати (Фиг. 17) показват добра корелация с проведените теоретични изчисления, тъй като всички съединения притежават близка, а някои от тях и по-висока активност от положителните стандарти Мелдониум и MeGBB.



Фигура 17. Процент на инхибиране на изследваните хетероциклени гама-бутиробетаини при концентрация на инхибитора 5 mM.

Точната стойност на IC_{50} за всеки инхибитор определихме чрез построяване на зависимост на процента инхибиране (%inh) за осем различни концентрации на инхибитора $\{[Inh]\}$, разпределени равномерно около ориентировъчно очакваните стойности за IC_{50} . Всяко измерване е проведено трикратно в три последователни дни. Получените осреднени стойности са обобщени на Фигура 18.



Фигура 18. Измерени IC₅₀ стойности за съед. 1-7 и изследваните етилови естери за някои от тях.

От представените на Фигура 18 резултати се вижда, че всички изследвани съединения имат инхибираща способност в ниската милимоларна област (IC₅₀ = 2,24-43,6 mM), като някои от тях са по-активни от положителните стандарти Мелдонииум и MeGBB (IC₅₀ = 11,4 и 9,32 mM, съответно). В посока връзката структура – активност могат да се направят следните обобщени изводи:

- обемът на заместителя на гама-позиция влияе пряко върху афинитета на изследваните съединения, като **увеличаването на обема е пропорционално на наблюдаваната способност за инхибиране**. Например, за ароматните производни редът на повишаване на активността е **Pyr-GBB < Mim-GBB < DMAP-GBB < i-qui-GBB**, което е в съответствие с нарастване обемите на заместителите. Също, инхибиторът произведен на пиролонин (**Pyr-GBB**) демонстрира значително по-висока стойност за IC₅₀ (14,1 mM) спрямо неговия шестчленен аналог произведен на пиперидин (**Pip-GBB**, IC₅₀ = 5,78 mM). В подкрепа на тези наблюдения е и факта, че съединението с най-обемистия изохинолиниев фрагмент (**i-qui-GBB**) показва най-висока инхибираща способност (IC₅₀ = 2,24 mM);
- **наличието на свободна карбоксилна група е предпоставка за по-висока активност**. Тази зависимост става очевидна при сравняване на активностите на бетаиновите

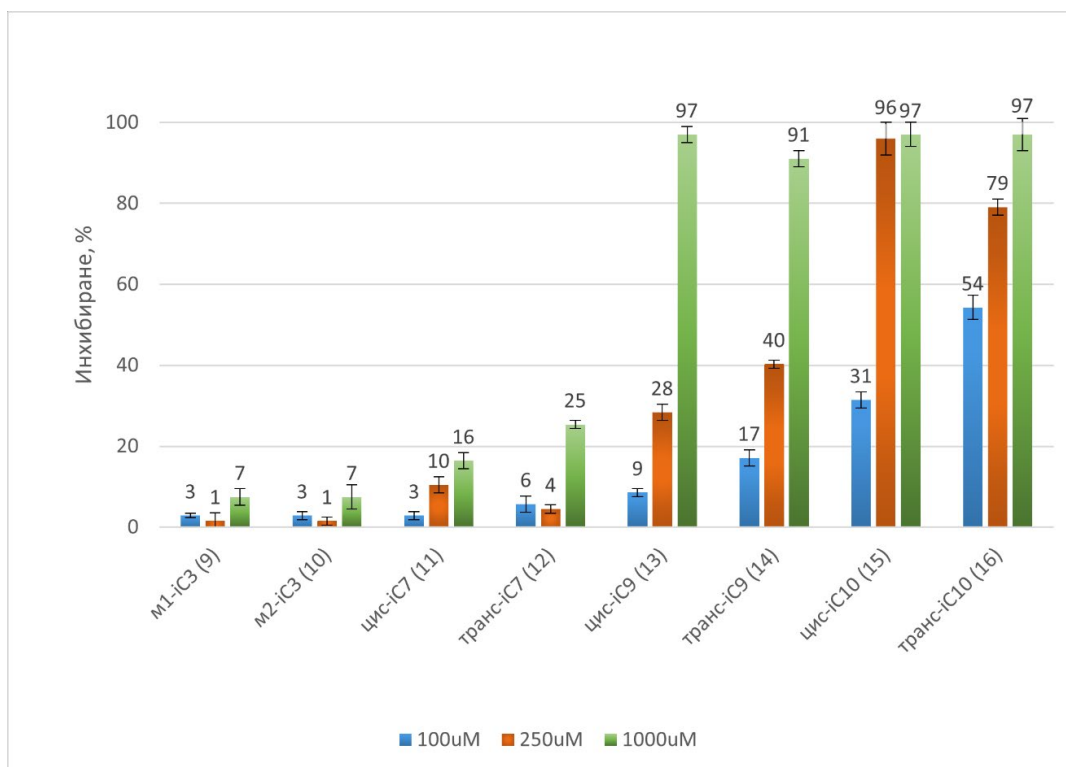
съединения с тези на съответстващите им естери, при които IC_{50} стойностите са двукратно по-високи;

- **повишаване на полярността на заместителя в гама-позиция значително намалява инхибиращата способност**, както може да се види при сравнение на активността на производните на *N*-метилморфолин с тези на *N*-метилпиперидин. Причина за това е наличието на кислороден атом в цикъла на морфолин, който увеличава полярността на групата спрямо пиперидин и ограничава хидрофобните взаимодействия на инхибитора в хидрофобния джоб на ензима.
- **ароматният характер на заместителя в гама-позиция не е определящ фактор за по-висока активност**, тъй като инхибиторите с ароматен заместител притежават сходен или по-нисък афинитет от този на алифатните им аналози.

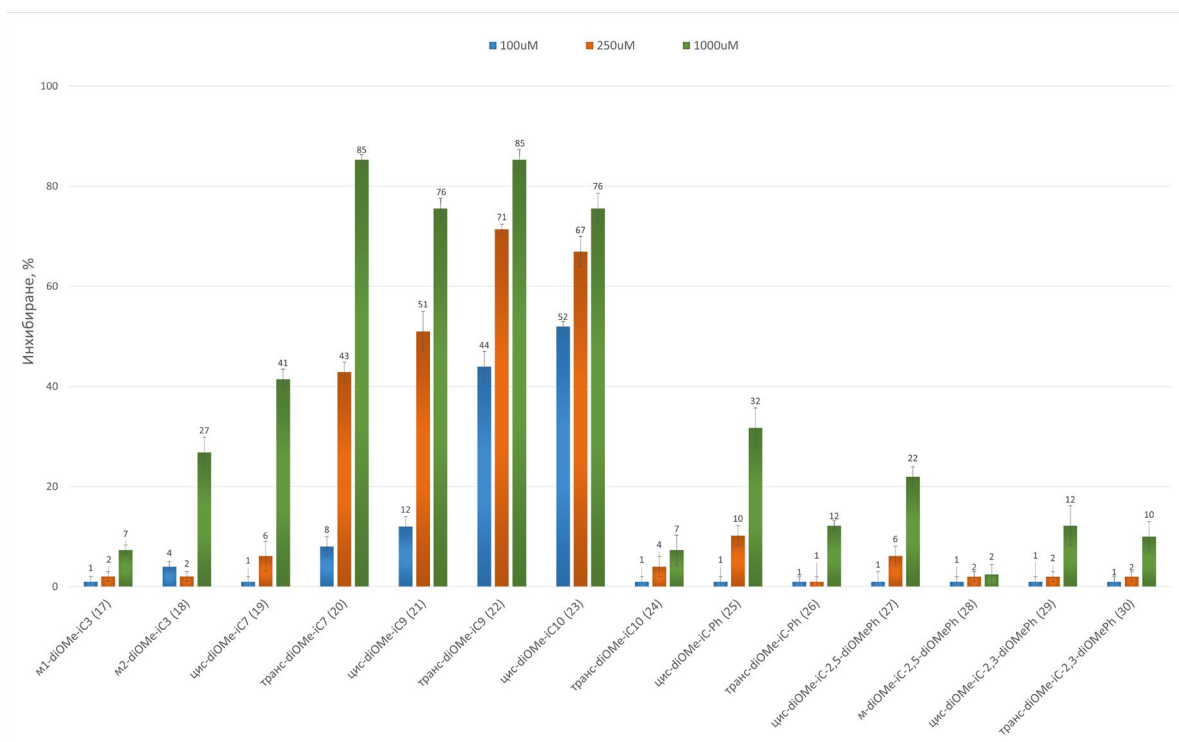
От така изведените зависимости може да се направи заключението, че наличието на свободна карбоксилна група и обемист неполярен заместител в гама-позиция е предпоставка за по-ефективно взаимодействие на инхибиторите с активния център на ензима.

1.3.1.2. Определяне на инхибираща активност на серия изокумаринови производни

За да установим активността на *CrAT* в присъствието на синтезираните изокумаринови производни и да оценим ефекта от дължината на въглеродната верига на алкиловия заместител върху биологичната активност, ние проведохме измервания в три различни концентрации на веществата – 100 μ M, 250 μ M и 1000 μ M. Стойностите бяха отчетени в рамките на първата минута след началото на реакцията и степента на инхибиране беше определена чрез кинетичен подход, както е описано в раздел 3.3.1. Резултатите са обобщени на Фигури 51 и 52, съответно за 3-алкил-3,4-дихидроизокумарин-4-карбоксилните киселини и 3-алкил/3-арил-6,7-диметокси-3,4-дихидроизокумарин-4-карбоксилните киселини. Резултатите са представени като %-ти инхибиране.



Фигура 19. Процент на инхибиране на *CrAT* в присъствие на (±)-3-алкил-3,4-дихидроизокумарин-4-карбоксилните киселини.



Фигура 20. Процент на инхибиране на *CrAT* в присъствие на (±)-3-алкил-6,7-диметокси-3,4-дихидроизокумарин-4-карбоксилните киселини.

Всички изследвани съединения демонстрират инхибиращи свойства. С изключение на смесите от *цис* и *транс* изомерите на 6,7-диметокси-3-пропил-3,4-дихидроизокумарин-4-карбоксилна киселина и тези на 3-пропил-3,4-дихидроизокумарин-4-карбоксилната киселина, както и 3-арил-заместените 6,7-диметокси-3-пропил-3,4-дихидроизокумарин-4-карбоксилни киселини, съединенията проявяват инхибиращи свойства в микромолярни концентрации, докато 3-пропил заместените аналози и 3-арил-заместените демонстрират слаб инхибиращ ефект единствено в концентрация от 1 mM. Сравнени с положителните стандарти Мелдониум и MeGBB, изокумариновите производни с хептилов остатък в 3-та позиция на пръстена проявяват сходна биологична активност. В концентрация от 1 mM и четирите съединения – *цис*-iC7 (**11**), *транс*-iC7 (**12**), *цис*-diOMe-iC7 (**19**) и *транс*-diOMe-iC7 (**20**), понижават активността на ензима с от 16% до 41%, докато Мелдониум и MeGBB инхибират ензима с 50% при концентрации от порядъка 9-11 mM ($IC_{50} = 11,4 \pm 1,3$ и $9,32 \pm 0,47$ mM, съответно). Наблюдава се тенденция, при която с увеличаване дължината на въглеродородната верига в алкиловия остатък нараства активността на съединенията. Нонил-заместените изокумарини – съединения **13**, **14**, **21** и **22**, са по-активни от използваните контроли с предполагаемо един порядък по-ниски стойности за IC_{50} . В концентрация от 250 μ M, вещества **13** и **14** инхибират ензимно катализирания процес с около 30-40% (Фиг. 19). В същите количества 6,7-диметокси-заместените им аналози – **21** и **22**, проявяват по-висока активност (50-70%). Най-активни съединения от серията са 3-децилзаместените изокумаринови производни, за които стойностите за IC_{50} са от порядъка на 100 μ M.

Не се наблюдава съществена промяна в биологичната активност при включване на допълнителни заместители – метокси групи, в 6-та и 7-ма позиция на изокумарините, което показва, че наличието на етерна функционална група не води до образуване на очакваните допълнителни водородни връзки между кислородния атом от групата и АК от активния или друг център на ензима. В допълнение, пространствената ориентация на карбоксилната група и алкиловия остатък също не оказва съществено влияние върху активността. Съпоставяйки данните за инхибиращата способност на всяка двойка от диастереоизомери, разликата в стойностите за двете форми е под 10%.

От така получените резултати, може да се направи заключението, че основният елемент, обуславящ инхибиращия ефект за изокумариновите производни, е наличието на хидрофобен заместител от средно- или дълговерижна въглеродородна група в трета позиция на молекулата. В подкрепа на това твърдение е и фактът, че заместването на алкиловия фрагмент в молекулата на изокумарините с фенилов или диметоксифенилов остатък води до получаване на инхибитори, проявяващи активност, сходна с тази на 3-пропилзаместените съединения (Фиг. 20).

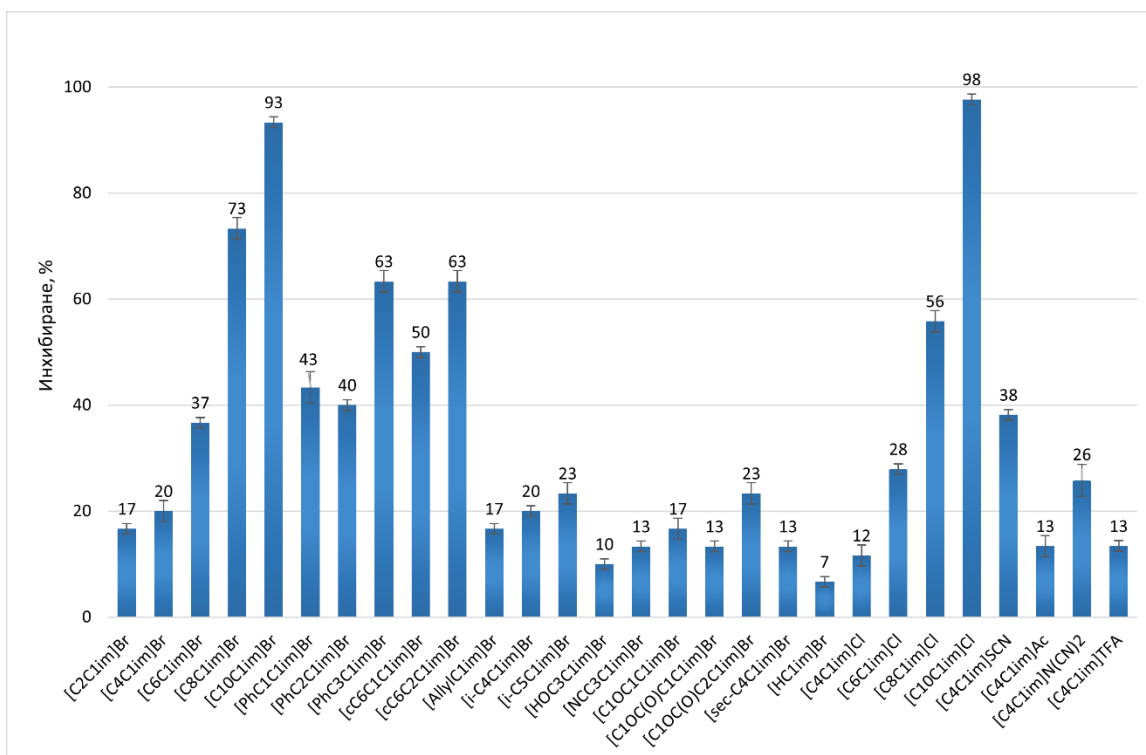
Поради високия афинитет на карнитин ацетилтрансферазата към късо верижни мастни киселини (C2-C4), наблюдаваната зависимост за нарастване активността на съединенията с увеличаване дължината на въглеродородната верига предполага, че механизмът на инхибиране на целевите съединения е най-вероятно от безконкурентен или смесен тип. За да потвърдим тази хипотеза, за най-активните диастереоизомерни двойки – *цис*-diOMe-iC10 (**23**), *транс*-diOMe-iC10 (**24**), *цис*-iC10 (**15**) и *транс*-iC10 (**16**), бяха проведени допълнителни кинетични изследвания, както е описано в раздел 3.3.2., а резултатите от проведените експерименти са описани в раздел 2.3.2.

1.3.1.3. Определяне на IC₅₀ на серия йонни течности

Потенциалната активност на серията от йонни течности по отношение на *CrAT* бе определена по вече описания начин, като избраните от нас структурни фрагменти позволяват оценката на следните фактори:

- дължината на въглеродородната верига в състава на имидазолиевия катион;
- наличието на ненаситена двойна връзка или ароматен фрагмент в структурата на заместителя при N3 в имидазолиевия пръстен;
- функционализиране на алкиловия заместител при N3 в имидазолиевия катион чрез включване на полярни заместители (*N*- или *O*-съдържащи);
- разклоняване във въглеродна верига на алкиловия заместител;
- влияние на вида на аниона.

За да оценим влиянието на тези структурни промени, първата ни задача бе изследване на всички синтезирани ЙТ при една и съща концентрация – 5 mM. Резултатите от този експеримент са представени на Фигура 21.

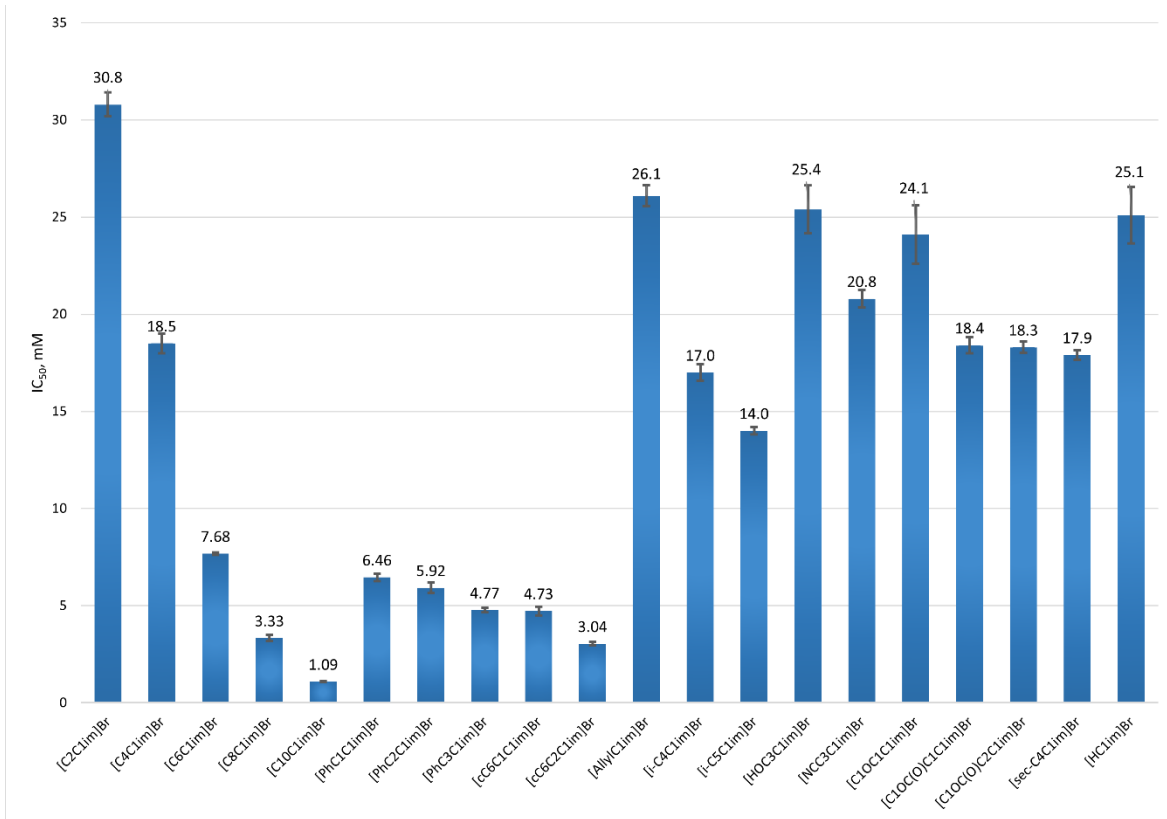


Фигура 21. Процент на инхибиране на изследваните ЙТ при концентрация на инхибитора 5 mM.

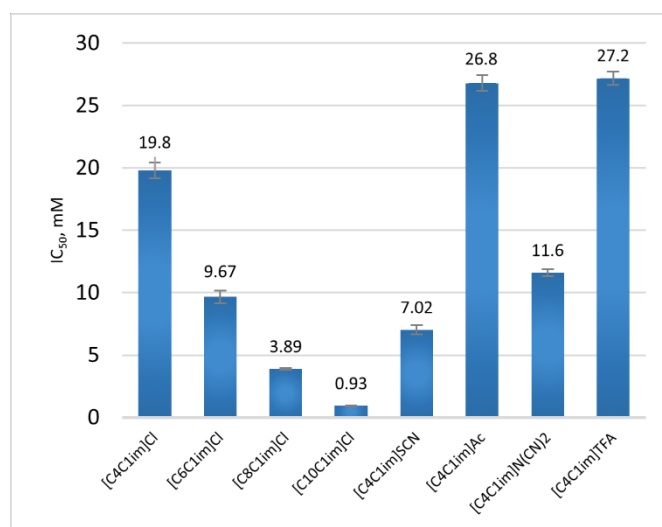
Всички изследвани съединения проявяват инхибираща активност при използваната 5 mM концентрация. Две от йонните течности – [C₁₀C₁im]Br и [C₁₀C₁im]Cl, демонстрират изключително висока активност (почти 100% инхибиране), а с най-ниска активност е [HC₁im]Br, при който инхибирането е едва 7%. Това показва, че използването на *N*-метилимидазолиев катион е подходящ избор за целите на настоящите изследвания за установяване връзката структура – активност. Алкилзаместените ЙТ [C₆C₁im]Br и [C₈C₁im]Br, както и тези с пръстенна система като заместител (бензеново ядро или циклохексан), проявяват добра инхибираща способност – инхибиране между 40% и 70%, а останалите съединения са слабо активни (инхибиране в интервала 10-30%).

От така получените първоначални резултати, може да се направи заключението, че всички ЙТ имат инхибиращ ефект върху активността на карнитин ацетилтрансферазата с предполагаеми стойности за IC₅₀ в ниската милимоларна област, а за някои от веществата и в микромоларната.

С цел по-задълбочено изследване на връзката структура – активност, определихме и точните стойности за IC_{50} за всички ЙТ. Изследванията проведохме както бе описано в раздел 2.3.1.1., а получените резултати са обобщени и представени на Фиг. 22 и Фиг. 23.



Фигура 22. Измерени IC_{50} стойности за изследваните йонни течности от групата на $[C_nC_{1im}]Br$.



Фигура 23. Измерени IC_{50} стойности за изследваните йонни течности от групата на $[C_nC_{1im}]Cl$ и $[C_4C_{1im}]A$.

От представените резултати се вижда ясна връзка между структурни елементи в състава на ЙТ и активността им спрямо изследвания ензим, което позволява да се направят обобщения и изводи в посока връзката структура – активност.

Дължината на въглеводородната верига оказва съществен ефект върху активността на CrAT. Зависимостта е правопрпорционална – колкото по-дълга е страничната веригата, толкова по-изявена е инхибиращата активност на съединението. Тази тенденция може да се проследи в серията: $[C_2C_1im]Br < [C_4C_1im]Br < [C_6C_1im]Br < [C_8C_1im]Br < [C_{10}C_1im]Br$ (Фиг. 22). $[C_2C_1im]Br$ инхибира ензима със стойност за $IC_{50} = 30,8 \pm 0,6$ mM, докато $[C_{10}C_1im]Br$ – с $IC_{50} = 1,09 \pm 0,02$ mM. Зависимостта се потвърждава и в серията $[C_4C_1im]Cl < [C_6C_1im]Cl < [C_8C_1im]Cl < [C_{10}C_1im]Cl$, при която отново най-активното съединение е ЙТ с децилов заместител (Фиг. 23). Тенденцията се запазва и при ЙТ със заместител, различен от права въглеводородна верига. Съпоставяйки данните за $[cC_6C_1C_1im]Br$ и $[cC_6C_2C_1im]Br$ се вижда, че наличието на допълнителна метиленова група в заместителя при $[cC_6C_2C_1im]Br$ води до понижаване на стойностите за IC_{50} с приблизително 35% – $IC_{50} ([cC_6C_1C_1im]Br) = 4,73 \pm 0,23$ mM, $IC_{50} ([cC_6C_2C_1im]Br) = 3,04 \pm 0,10$ mM. Същият модел се наблюдава и в серията ЙТ с ароматен заместител – $[PhC_1C_1im]Br < [PhC_2C_1im]Br < [PhC_3C_1im]Br$ (Фиг. 22). Поради високия афинитет на CrAT към късоверижни мастни киселини (C2-C4) и липсата на активност към средно- и дълговерижни киселини, наблюдаваната тенденция при изследваните йонни течности може да се обясни чрез взаимодействие на изследваните съединения с участък от ензима, различен от активния център. Удължаването на въглеводородната верига води до повишаване липофилните свойства на молекулата, което е предпоставка за по-силни хидрофобни взаимодействия между хидрофобна област на ензима и тестваното съединение.

Наличието на ненаситена двойна връзка или ароматен фрагмент в структурата на заместителя при N3 в имидазолиевия пръстен не е предпоставка за засилване афинитета на тестваните съединения. Поради наличието на ароматни аминокиселини в структурата на активния център на CrAT – хистидин (H), тирозин (Y) и фенилаланин (F), включването на ароматен заместител като бензеново ядро в алкиловия фрагмент на йонните течности се очаква да доведе до допълнително π - π взаимодействие между тези АК и $[PhC_1C_1im]Br$, $[PhC_2C_1im]Br$ и $[PhC_3C_1im]Br$, както и с двойната връзка на $[AllylC_1im]Br$. Наблюдаваните от

нас резултати по отношение на активността на ензима в присъствие на тези ЙТ доказват, че съединенията са инхибитори на CrAT, със стойности за IC₅₀ в диапазона 4,5 – 6,5 mM за фенил-съдържащите ЙТ и 26,1 ± 0,5 mM за [AllylC₁im]Br. Съпоставяйки стойностите за [PhC₁C₁im]Br, IC₅₀ = 6,46 ± 0,20 mM и неговия алифатен аналог – [cC₆C₁C₁im]Br, IC₅₀ = 4,73 ± 0,23 mM, [PhC₁C₁im]Br е по-слаб инхибитор. Тенденцията се запазва и при двойката [PhC₂C₁im]Br, IC₅₀ = 5,92 ± 0,26 mM и [cC₆C₂C₁im]Br, IC₅₀ = 3,04 ± 0,10 mM. Тъй като алифатният аналог на [AllylC₁im]Br е [C₃C₁im]Br, който не е включен в експериментите, инхибираща способност на първия може да се оцени при сравнение с тази на [C₄C₁im]Br и [C₂C₁im]Br. Вижда се, че наличието на двойна връзка не е фактор за по-висока активност, тъй като стойността за IC₅₀ на [AllylC₁im]Br, IC₅₀ = 26,07 ± 0,5 mM е по-близка с тази на [C₂C₁im]Br, IC₅₀ = 30,8 ± 0,6 mM, сравнена с IC₅₀ = 18,5 ± 0,5 mM за [C₄C₁im]Br.

Функционализирането на алкиловия заместител при N3 в имидазолиевия катион чрез включване на полярни заместители (N- или O-съдържащи), както и наличието на разклонена верига повлиява незначително активността. За оценка на първия фактор изследвахме влиянието на три кислород-съдържащи функционални групи – алкохолна, етерна и естерна, както и на една азот-съдържаща група – нитрилна. От резултатите представени на Фигура 22 се вижда, че ЙТ: [C₄C₁im]Br, [НОС₃C₁im]Br, [C₁OC(O)C₂C₁im]Br, [C₁OC(O)C₁C₁im]Br, [C₁OC₁C₁im]Br, [NCC₃C₁im]Br демонстрират IC₅₀ стойности в интервала 18-25 mM. Подобна на описаната зависимост се наблюдава и при сравняване на IC₅₀ стойностите за [C₄C₁im]Br, [*i*-C₄C₁im]Br и [*sec*-C₄C₁im]Br, което показва, че разклонението в страничната верига също е несъществен фактор. Получените IC₅₀ стойности са статистически различни и това позволява по детайлна дискусия по отношение влиянието на отделните заместители, но ние смятаме, че подобна дискусия би била спекулативна и по тази причина не е осъществена.

Влиянието на аниона върху активността на изследваните ЙТ е в съответствие със серията на Хофмайстер. Ефектът на анионите върху стабилността и активността на различни ензими е обект на множество изследвания [Casace et al., 1997; Zhang & Cremer, 2006; Gregory et al., 2022], като е установено, че основни влияещи фактори са техния размер и заряд. Малките и силно заредени йони се наричат космотропни (структуриращи). Тези аниони разрушават водородните връзки между водните молекули и образуват нови, като по този

начин създават нова структура на средата и увеличават общата полярност. Този ефект води до понижена разтворимост на неполярни съединения като протеинови макромолекули, което е причината космоетропните йони да повишават стабилността на ензимите. От друга страна, големи и едновалентни йони също нарушават водородните връзки между водните молекули, но те не създават нова организирана структура и по тази причина се наричат хаотропни (деструктуриращи). Като такива, те намаляват общата подреденост в разтвора и водните молекули могат директно да взаимодействат с аминокиселинните остатъци на ензима. Нещо повече, обемните едновалентни йони са солватирани в значително по-малка степен, което също позволява директното им взаимодействие с протеиновата структура. Редът на космоетропно-хаотропните свойства на йоните е обобщен в серията на Хофмайстер [Mazzini & Craig, 2017]. Ние изследваме ефекта на шест различни аниона – тиоцианат (SCN^-), дицианамид (DCA^-), бромид (Br^-), хлорид (Cl^-), ацетат (Ac^-) и трифлуороацетат (TFA^-) като противойони на $[\text{C}_4\text{C}_{1\text{im}}]^+$. Изчислените стойности за IC_{50} на тестваните съединения съответстват на серията Хофмайстер. Тиоцианатът, който е най-хаотропният йон в серията, има най-голям ефект върху активността на *CrAT* – $\text{IC}_{50} = 7,02 \text{ mM} \pm 0,37 \text{ mM}$, докато ацетатният йон, който е слабо космоетропен, повлиява по-слабо ензимната активност ($\text{IC}_{50} = 26,8 \pm 0,6 \text{ mM}$). Въпреки че точната позиция на дицианамида в серията на Хофмайстер не е установена, DCA^- е хаотропен йон [Hernandez-Fernandez et al., 2009; Hyde et al., 2017] и като такъв той инхибира *CrAT* с $\text{IC}_{50} = 11,6 \pm 0,3 \text{ mM}$, което го прави по-активен от бромидния анион. Един от изследваните аниони – TFA^- , прояви необичайна инхибираща активност. Въпреки че е хаотропен анион [Mazzini & Craig, 2017], стойността за IC_{50} на TFA^- е $27,2 \pm 0,5 \text{ mM}$. От така получените резултати, $[\text{C}_4\text{C}_{1\text{im}}]\text{TFA}$ е с най-ниска активност от серията, което може да се обясни със специфични взаимодействия с активния или друг център на ензима.

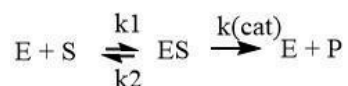
В обобщение, получените експериментални данни потвърждават, че йонните течности на базата на *N*-метилимидазолиев йон са потенциални инхибитори на *CrAT*. По отношение на връзката структура – активност се наблюдава ясна зависимост между структурните елементи в състава на йонните течности и активността им спрямо изследвания ензим. Като най-значими фактори за повишена активност могат да се открият дължината на въглеродородната верига при N3 атома от имидазолиевия пръстен, както и деструктуриращата способност на аниона.

1.3.2. Определяне механизма на инхибиране на най-активните съединения

Определянето на стойностите за IC_{50} е подходящо за провеждане на сравнителен анализ и установяване на връзката структура – активност за серия от структурни аналози, но този параметър не дава пълна представа за специфичните взаимодействия инхибитор-ензим. За по-пълно охарактеризиране и установяване механизма на действие е необходимо да се определи влиянието му върху стойностите на K_m и V_{max} . V_{max} е характеристика на ензима и зависи единствено от температурата, активността на ензима и неговата концентрация:

$$V_{max} = k(cat) \times [E]^0,$$

където $[E]^0$ е началната концентрация на ензима и $k(cat)$ е скоростната константа на процеса на превръщане на ензим-субстратния комплекс $[ES]$ в свободен ензим и продукт:

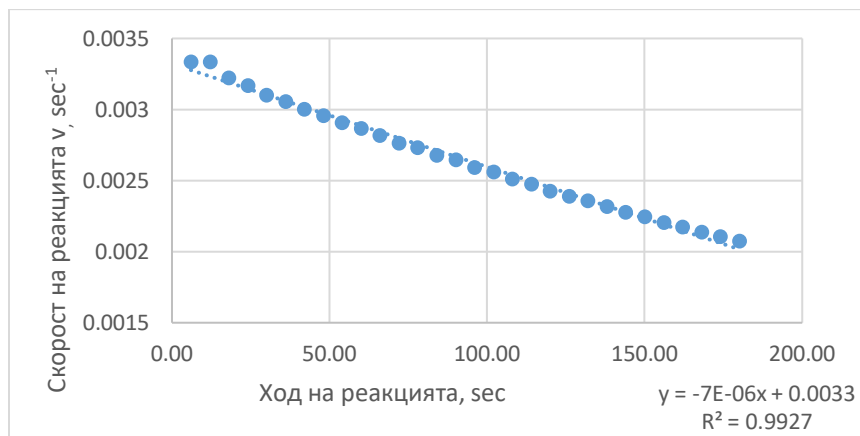


K_m е характеристика на ензимно-субстратното взаимодействие:

$$K_m = \frac{k(cat) + k_2}{k_1}.$$

Механизмът на инхибиране може да се определи чрез проследяване на зависимостта на началната скорост на реакцията v_0 от концентрацията на субстрата $[S]$ при различни концентрации на инхибитора $[I]$ и следващо изчисляване на константата на инхибиране K_i . Изследванията проведохме за най-активните вещества от трите серии – 4-(изохинолин-2-ил) бутаноат (**7**) от серията хетероциклени гама-бутиробетаини, *цис*- и *транс*-изомерите на (\pm)-3-децил-3,4-дихидроизокумарин-4-карбоксилната киселина и нейния 6,7-диметокси-заместен аналог, съединения **15**, **16**, **23** и **24**, и $[C_{10}C_{11}m]Br$ от серията на ЙТ. За намиране на K_i си поставихме две задачи: (1) определяне на v_0 и (2) определяне на влиянието на всеки инхибитор върху характеристичните параметри на ензима: K_m и V_{max} .

За осъществяване на първата задача избрахме метод предложен от Baici [Baici, 2015], при който v_0 се изчислява от отреза на зависимостта v (скорост) vs. t (време) за линейния интервал на всяка реакция. Прилагането на този подход повишава достоверността на резултатите и минимизира грешката при отчитане на скоростта в момент различен от нулевия. Фигура 24 е представителен пример, който демонстрира описания подход.



Фигура 24. Зависимостта на скоростта на реакция v от хода на реакция. Скоростта намалява линейно от 18 секунда до края на измерването – 180 секунди.

Подобно на голямата част от графиките получени по този начин, и тук се наблюдава отклонение в линейността в рамките на първите 12 sec. Завишените стойности на скоростта в първите моменти на реакцията може да се отдадат на специфичността на експерименталната процедура. Поради тази причина, за построяване на зависимостите и изчисляване на v_0 използвахме интервала $t = 30-180$ sec за всички проби.

Изследванията проведохме с шест серии от по пет измервания при еднакви реакционни условия, както е описано в Експерименталната част (3.3.2). В първата серия бяха измерени пет реакционни смеси, всяка от които съдържа различни количества от субстрата – L-карнитин, в отсъствие на инхибитор. В останалите пет серии към реакционните смеси добавяхме точно определено за дадената серия количество инхибитор. Всички експерименти проведохме трикратно, в рамките на три дни. Началната скорост, v_0 е изчислена в размерност M/sec чрез използването на закона на Буге-Ламберт-Беер, моларен екстинционен коефициент на **TNB**⁻ при 405 nm $\epsilon = 18000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ и дължина на лъча $l = 0.8336 \text{ cm}$. Концентрациите на инхибиторите избрахме да са в границите 0.2-5 пъти K_i за всеки инхибитор, като стойността за K_i изчислихме предварително с използването на вече определената стойност за IC_{50} по дадената формула, след допускане, че механизмът на инхибиране е конкурентен:

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[S]}{K_m}}$$

където $[S] = 50,52 \mu\text{M}$.

Концентрациите на субстрата бяха избрани в границите 0.2-5 пъти стойността на K_m ($K_m = 0,3$ mM за използвания ензим). Работата в рамките на тези количества субстрат и инхибитор осигурява достатъчен процент инхибиране, който да може да бъде отчетен и при по-високи концентрации на субстрат, както и необходимото количество субстрат за протичане на реакция дори при високи концентрации на инхибитор.

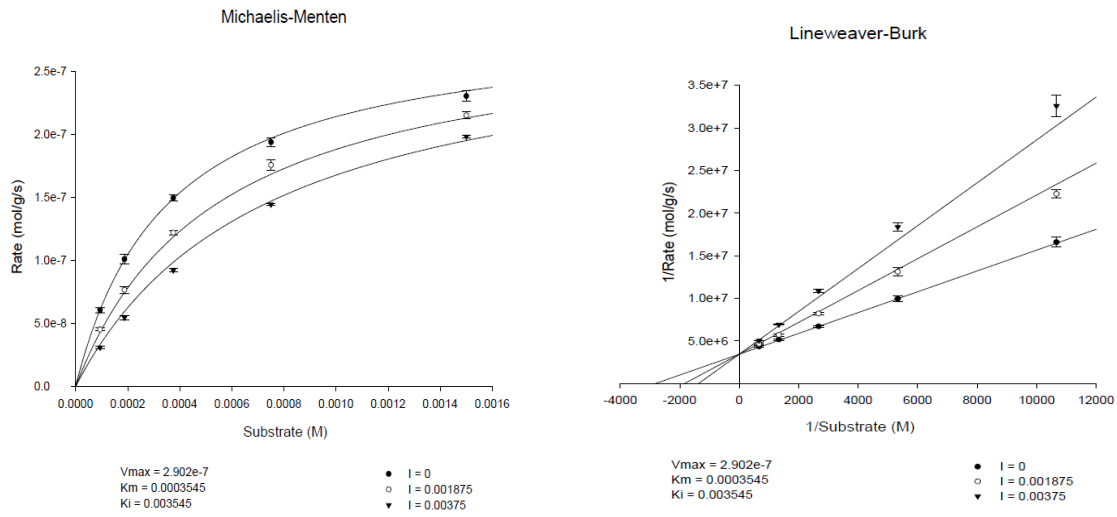
От експериментално получените данни установихме, че за най-ниските концентрации на някои от инхибиторите, стойностите за скоростта попадат в рамките на отклонението за празните проби и реалният процент на инхибиране при тях е нула. Поради тази причина тези стойности не бяха взети предвид в последващите изчисления.

Втората задача бе определянето на механизма на инхибиране и изчисляване на K_m , V_{max} и K_i . За осъществяване на тази задача използвахме програмата Sigma Plot, версия 12.5, в която се съдържа интегриран модул за множествена линейна и нелинейна регресия, и интерполация към модели на отделните типове инхибиране – конкурентно, неконкурентно, безконкурентно, смесено (пълни или частични). Освен графично представяне и изчисляване на K_m , V_{max} и K_i , Sigma Plot позволява да се даде предпочитание на определен механизъм на инхибиране, за който корелационните фактори [коефициент на детерминация (r^2) и информационен коефициент на Акайке (AIC)] са с най-висока абсолютна стойност, а $S_{y,x}$ – най-ниска. Получените резултати за съответните корелационни фактори на най-вероятния модел инхибиране за всяко съединение са представени в Таблица 6.

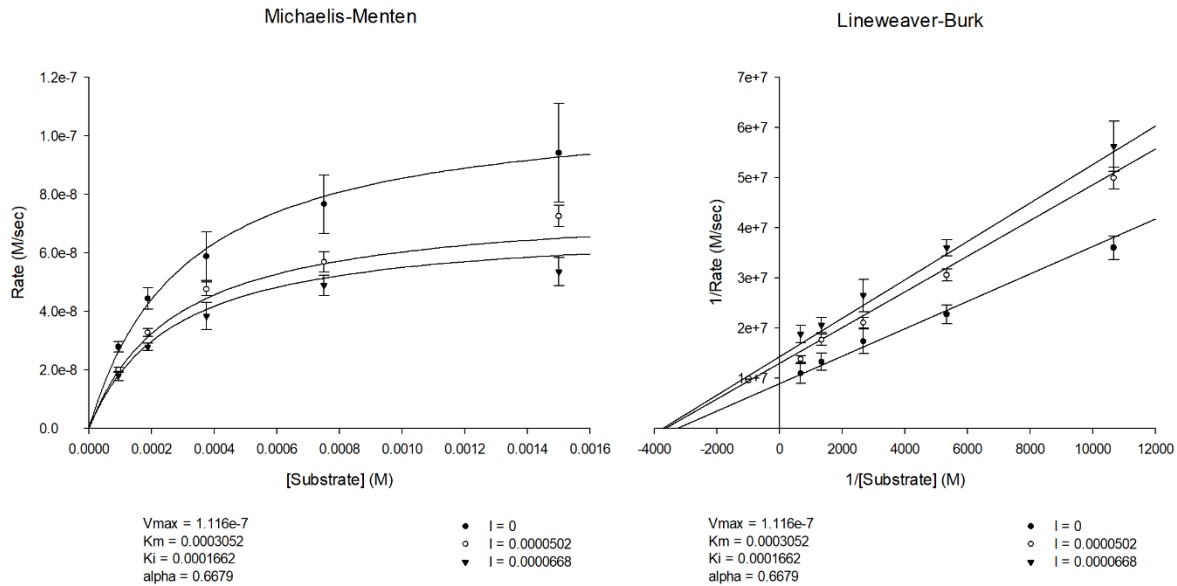
Таблица 6. Получените резултати за съответните корелационни фактори на най-вероятния модел инхибиране за всяко съединение.

Съединение	Тип инхибиране	K_i [mM]	α	r^2	AIC	$Sy.x$
<i>i</i> -qui-GBV (7)	Конкурентен	3,55	-	0,99382	-1710,565	5,215e-9
	Неконкурентен	1,94	1	0,97754	-1652,521	9,938e-9
	Безконкурентен	8,72	-	0,95923	1623,139	1,355e-8
цис- <i>i</i> C10 (15)	Смесен	0,25	0,59	0,94222	-1119,478	6,879e-9
	Неконкурентен	0,16	1	0,94147	-1121,990	6,794e-9
	Безконкурентен	0,11	-	0,93823	-1120,373	6,980e-9
	Конкурентен	0,05	-	0,89312	-1103,924	9,182e-9
транс- <i>i</i> C10 (16)	Смесен	0,17	0,67	0,90210	-1115,411	7,362e-9
	Неконкурентен	0,12	1	0,90156	-1118,146	7,244e-9
	Безконкурентен	0,08	-	0,84882	-1105,276	8,977e-9
	Конкурентен	0,04	-	0,84882	-1105,276	8,977e-9
цис-diOMe- <i>i</i> C10 (23)	Смесен	0,13	0,97	0,98027	-1562,764	2,987e-9
	Неконкурентен	0,13	1	0,98027	-1565,380	2,947e-9
	Безконкурентен	0,087	-	0,97141	-1550,555	3,547e-9
	Конкурентен	0,03	-	0,93830	-1519,782	5,211e-9
транс-diOMe- <i>i</i> C10 (24)	Смесен	0,38	0,21	0,97682	1548,364	3,576e-9
	Безконкурентен	0,07	-	0,97551	-1548,795	3,626e-9
	Неконкурентен	0,11	1	0,97122	-1542,332	3,931e-9
	Конкурентен	0,03	-	0,89542	-1490,723	7,493e-9
[C ₁₀ C _{1im}]Br	Смесен	0,77	3,00	0,96794	-2782,048	8,425e-9
	Неконкурентен	1,46	1	0,96435	-2776,382	8,823e-9
	Конкурентен	0,40	-	0,95716	-2762,621	9,670e-9
	Безконкурентен	0,97	-	0,94465	-27433,98	1,099e-8

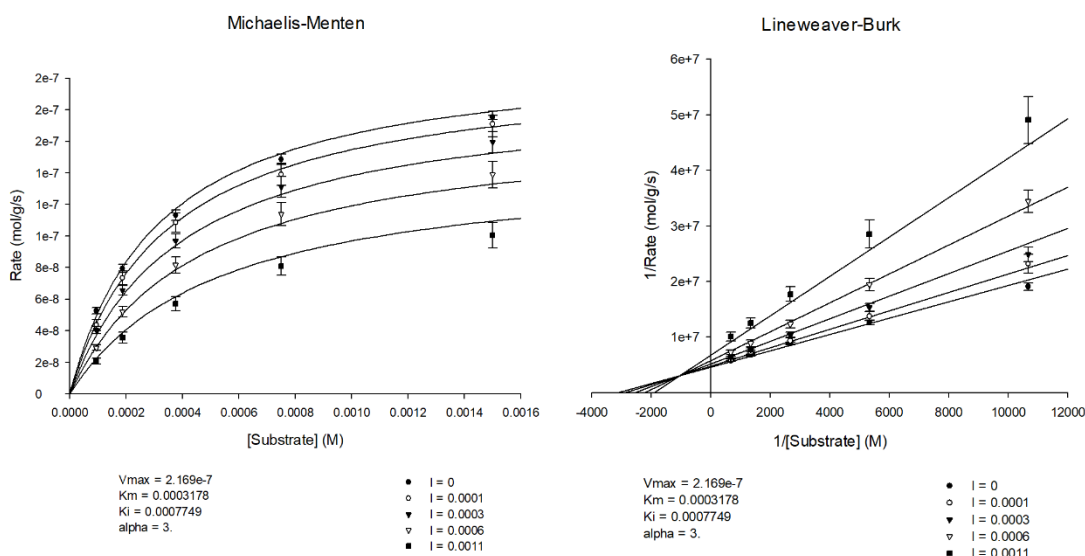
На Фигура 25-27 са показани резултатните графики представящи зависимостта на началната скорост v_0 (mol/g.sec) от концентрацията на субстрата [M] по моделите на Михаелис-Ментен и Лайнуивър-Бърк за избрани от нас съединения – *i*-qui-GBV (7), транс-*i*C10 (16) и [C₁₀C_{1im}]Br.



Фигура 25. Графики представящи зависимостта на началната скорост v_0 (mol/g.sec) от концентрацията на субстрата [M] по моделите на Михаелис-Ментени и Лайнуивър-Бърк за *i*-qui-GBB (7).



Фигура 26. Графики представящи зависимостта на началната скорост v_0 (mol/g.sec) от концентрацията на субстрата [M] по моделите на Михаелис-Ментени и Лайнуивър-Бърк за *транс*-iC10 (16).



Фигура 27. Графики представящи зависимостта на началната скорост v_0 (mol/g.sec) от концентрацията на субстрата [M] по моделите на Михаелис-Ментени и Лайнуивър-Бърк за $[C_{10}C_{1im}]Br$.

Получените резултати еднозначно показват, че съединение **7** е конкурентен инхибитор на CrAT с $K_i = 3,5$ mM, което е сравнимо с инхибиращата способност на лекарствения препарат Мелдониум ($K_i = 1,63$ mM). Изокумариновите производни – *цис-/транс*-iC10 (**15**, **16**); *цис-/транс*-diOMe-iC10 (**23**, **24**), както и най-активният представител на групата от ЙТ $[C_{10}C_{1im}]Br$ са инхибитори от смесен тип със стойности за K_i в границите 0,13-0,38 mM и 0,77 mM, съответно, като йонната течност предпочетено взаимодейства с ензима ($\alpha > 1$), докато при изокумарините се наблюдава т. нар. кооперативен ефект ($\alpha < 1$) – увеличаване на инхибиращата способност в присъствието на субстрат.

Обобщение и изводи

1. **Проведен е детайлен сравнителен анализ** на ензимите от семейството на карнитин ацилтрансферазите (*CAT*), с основен фокус върху структурните характеристики на активните центрове и стабилизиращите взаимодействия, благоприятстващи образуването на ензим-субстратни комплекси. Паралелно са изследвани познатите инхибитори на *CAT*, като са идентифицирани ключови структурни фрагменти, обуславящи повишена инхибираща активност. На основата на получените зависимости е **извършен рационален избор на целеви съединения като потенциални инхибитори на *CAT***. Изследваните съединения са категоризирани в три основни групи: хетероциклени аналози на гама-бутиробетин, 3,4-дизаместени 3,4-дихидроизокумарини (изокумарини) и йонни течности (ЙТ).
2. За предварителна оценка на тяхната активност е **проведено докинг изследване спрямо два ключови ензима** от семейството – карнитин ацетилтрансфераза (*CrAT*) и карнитин палмитоилтрансфераза 2 (*CPT2*). Теоретичните изчисления показаха, че целевите съединения се свързват по-ефективно с активния център в сравнение с естествените субстрати или доказани инхибитори. Получените резултати демонстрират потенциала на изследваните съединения да са инхибитори на *CrAT* и *CPT2* и така да повлияват бета-окислението на мастните киселини.
3. За проверка на валидността на изведените хипотези и установяване на връзката структура-активност са **синтезирани, пречистени, изолирани и охарактеризирани**: 1) 10 хетероциклени аналози на гама-бутиробетин; 2) 11 диастереомерни двойки изокумаринови производни и 24 йонни течности.
4. За избрани съединения от изокумариновата серия е **проведен конформационен анализ и са установени емпирични зависимости за еднозначно определяне на конфигурацията** на отделните диастереоизомери, когато общоприетият подход с използване на константите на купелуване не дава еднозначен отговор.
5. **Инхибиращата способност на получените съединения е оценена посредством *in vitro* изследвания** върху *CrAT* като моделен ензим. Всички изследвани съединения от серията на гама-бутиробетините проявяват инхибираща способност в ниската милимоларна област ($IC_{50} = 2,24-43,6$ mM), като някои от тях са по-активни от положителните стандарти Мелдониум (одобрено лекарство за третиране на ИБС под търговското наименование Mildronate®) и MeGBV (препарат в III^{та} фаза на клинично проучване), с $IC_{50} = 11,39$ и $9,32$ mM, съответно. Съединенията от групата на изокумариновите производни инхибират ензимната реакция при още по-ниски концентрации (IC_{50} в интервала 100 μ M-1 mM), а ЙТ показват сходна на демонстрираната от

гама-бутиробетаините активност ($IC_{50} = 0,93-30,8$ mM). Сравнение с получените от докинга резултати показва добра предсказваща способност на теоретичните изчисления.

6. **Изведени са връзките структура-активност** за трите серии съединения. **При групата на гама-бутиробетаините**, се наблюдават следните зависимости: ароматният характер на заместителя в гама-позиция не е определящ фактор за по-висока активност; естерифициране на карбоксилната група, както и повишаване на полярността на заместителя в гама-позиция значително намалява инхибиращата способност; увеличаването на обема на заместителите в гама-позиция е пропорционално на наблюдаваната способност за инхибиране. **При групата на изокумариновите производни** ключов елемент, обуславящ инхибиращия ефект, е наличието на хидрофобен алкилов заместител от средно- или дълговерижна група в трета позиция на молекулата. Не е установена зависимост по отношение на конфигурацията и заместването в ароматното ядро. **За серията от йонни течности** се наблюдава сходна зависимост по отношение на алкиловия заместител – нарастването на броя на въглеродните атоми в алкиловия остатък води до повишаване афинитета на ЙТ към CrAT. Наличието на ненаситена – двойна връзка, или ароматно ядро при N3 не води до съществена промяна на инхибиращата способност, докато включването на полярна група значително намалява активността.
7. **Определен е механизъмът на инхибиране** за най-активните представители от изследваните групи съединения. Установено е, че съединението *i*-qui-GBB (**7**) е обратим конкурентен инхибитор на CrAT с $K_i = 3,5$ mM, което е сравнимо с инхибиращата способност на лекарствения препарат Мелдониум ($K_i = 1,63$ mM). Изокумариновите производни – *цис*-/*транс*-iC10 (**15**, **16**); *цис*-/*транс*-diOMe-iC10 (**23**, **24**), както и най-активният представител на групата от ЙТ [C₁₀C₁im]Br са инхибитори от смесен тип със стойности за K_i в границите 0,13-0,38 mM и 0,77 mM, съответно, като йонната течност предпочетено взаимодейства с ензима ($\alpha > 1$), докато при изокумарините се наблюдава т. нар. кооперативен ефект ($\alpha < 1$) – увеличаване на инхибиращата способност в присъствието на субстрат.
8. Получените резултати показват възможността изследваните съединения да бъдат приложени като метаболитни модулатори и потенциала им за лечение на системни възпалителни процеси, исхемична болест, диабет и някои видове рак, при доказана бионаличност и ниска токсичност.

Литература

1. Althumiri, N., Basyouni, M., AlMousa, N., AlJuwaysim, M., Alzubair, R., BinDhim, N., Alkhamaali, Z., Alqahtani, S. (2021). Obesity in Saudi Arabia in 2020: Prevalence, Distribution, and Its Current Association with Various Health Conditions. *Healthcare*, **9**:311.
2. Baici, A. (2015). Kinetics of Enzyme-Modifier Interactions. Vienna Springer Vienna.
3. Barry, R. (1964). Isocoumarins. Developments since 1950. *Chem. Rev.*, **64**:229-260.
4. Black, P., Sandoval, A., Arias-Barrau, E., DiRusso, C. (2009). Targeting the fatty acid transport proteins (FATP) to understand the mechanisms linking fatty acid transport to metabolism. *Immunol. Endocr. Metab. Agents Med. Chem.* **9**:11-17.
5. Bogdanov, M., Palamareva, M. (2004). Cis/trans-Isochromanones. DMAP induced cycloaddition of homophthalic anhydride and aldehydes. *Tetrahedron*, **60**:2525-2530.
6. Bogdanov, M., Todorov, I., Manolova, P., Cheshmedzhieva, D., Palamareva, M. (2004). Configuration and conformational equilibrium of (\pm)-trans-1-oxo-3-thiophen-2-yl-isochroman-4-carboxylic acid methyl ester. *Tetrahedron Lett.*, **45**:8383-8386.
7. Cacace, M. G., Landau, E. M., Ramsden, J. J. (1997). The Hofmeister series: salt and solvent effects on interfacial phenomena. *Q. rev. biophys.*, **30**:241-277.
8. Capela, E., Santiago, A., Rufino, A., Tavares, A., Pereira, M., Mohamadou, A., Aires-Barros, M., Coutinho, J., Azevedo, A., Freire, M. (2019). Sustainable strategies based on glycine-betaine analogues ionic liquids for the recovery of monoclonal antibodies from cell culture supernatants. *Green Chem.*, **21**:5671-5682.
9. Chevalier, A., Zhang, Y., Khmour, O., Hecht, S. (2016). Selective Functionalization of Antimycin A Through an N-Transacylation Reaction. *Org Lett.*, **18**(10):2395-8.
10. Dega-Szafran, Z., Przybylak, R. (1997). Synthesis, IR and NMR studies of zwitterionic w-(1-pyrrolidine)alkanocarboxylic acids and their N-methyl derivatives. *J. Mol. Struct.*, **436**:107-12.
11. Đurašević, S., Stojković, M., Bogdanović, L., Pavlović, S., Borković-Mitić, S., Grigorov, I., Bogojević, D., Jasnić, N., Tosti, T., Đurović, S., Đorđević, J., & Todorović, Z. (2019). The Effects of Meldonium on the Renal Acute Ischemia/Reperfusion Injury in Rats. *Int. J. Mol. Sci.*, **20**:5747
12. Đurašević, S., Stojković, M., Sopta, J., Pavlović, S., Borković-Mitić, S., Ivanović, A., Jasnić, N., Tosti, T., Đurović, S., Đorđević, J., Todorović, Z. (2021). The effects of meldonium on the acute ischemia/reperfusion liver injury in rats. *Sci. rep.*, **11**:1305.
13. Feldman, P. L., Lambert, M. H., & Henke, B. R. (2008). PPAR modulators and PPAR pan agonists for metabolic diseases: the next generation of drugs targeting peroxisome proliferator-activated receptors?. *Curr. top. med. chem.*, **8**:728-749.
14. Foley, J. (1992). Rationale and application of fatty acid oxidation inhibitors in treatment of diabetes mellitus. *Diabetes Care.*, **15**(6):773-84.
15. Fritz, I., Schultz, S. (1965). Carnitine acetyltransferase. Inhibition by carnitine analogues and by sulfhydryl reagents. *J. Biol. Chem.*, **240**:2188-92.
16. Galan, A., Padros, A., Arambarri, M., Martin, S. (1998). Automation of a spectrophotometric method for measuring L-carnitine in human blood serum. *J. Automat. Chem.*, **20**(1):23-6.

17. Govindasamy, L., Kukar, T., Lian, W., Pedersen, B., Gu, Y., Agbandje-McKenna, M., Jin, S., McKenna, R., Wu, D. (2004). Structural and mutational characterization of L-carnitine binding to human carnitine acetyltransferase. *J. Struct. Biol.*, **146**(3):416-24.
18. Gregory, K., Elliott, G., Robertson, H., Kumar, A., Wanless, E., Webber, G., Craig, V., Andersson, G., Page, A. (2022). Mitochondrial and metabolic alterations in cancer cells. *Eur. J. Cell Biol.*, **101**:151225.
19. Hernández-Fernández, F., Ríos, A., Tomás-Alonso, F., Gómez, D., Villora, G. (2009). Stability of hydrolase enzymes in ionic liquids. *Can. J. Chem. Eng.*, **87**: 910-914.
20. Hsiao, Y., Jogl, G., Esser, V., Tong, L. (2006). Crystal structure of rat carnitine palmitoyltransferase II (CPT-II). *Biochem. Biophys Res. Commun.*, **346**(3):974-80.
21. Hyde, A., Zultanski, S., Waldman, J., Zhong, Y., Shevlin, M., Peng, F. (2017). General Principles and Strategies for Salting-Out Informed by the Hofmeister Series. *Org. Process. Res. Dev.* **21**:1355–1370.
22. Jariwala, N., Mehta, G. A., Bhatt, V., Hussein, S., Parker, K. A., Yunus, N., Parker, J. S., Guo, J. Y., Gatzka, M. L. (2021). CPT1A and fatty acid β -oxidation are essential for tumor cell growth and survival in hormone receptor-positive breast cancer. *NAR cancer*, **3**:zcab035.
23. Jaudzems, K., Kuka, J., Gutsaits, A., Zinovjevs, K., Kalvinsh, I., Liepinsh, E., Liepinsh, E., Dambrova, M. (2009). Inhibition of carnitine acetyltransferase by mildronate, a regulator of energy metabolism. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, **24**(6):1269-75.
24. Jogl, G., Tong, L. (2003). Crystal structure of carnitine acetyltransferase and implications for the catalytic mechanism and fatty acid transport. *Cell*, **112**(1):113-22.
25. Jogl, G., Hsiao, Y., Tong, L. (2005). Crystal structure of mouse carnitine octanoyltransferase and molecular determinants of substrate selectivity. *J. Biol. Chem.*, **280**(1):738-44.
26. Karplus, M. (1959). Contact Electron Spin Coupling of Nuclear Magnetic Moments. *J. Chem. Phys.* **30**:11-15.
27. Karplus, M. (1963). Vicinal Proton Coupling in Nuclear Magnetic Resonance. *J. Am. Chem. Soc.* **85**:2870-2871.
28. Keung, W., Ussher, J. R., Jaswal, J. S., Raubenheimer, M., Lam, V. H., Wagg, C. S., Lopaschuk, G. D. (2013). Inhibition of carnitine palmitoyltransferase-1 activity alleviates insulin resistance in diet-induced obese mice. *Diabetes*, **62**:711-720.
29. K., Satria, H., Miyamura, K., Tsuge, Y., Ninomiya, K., Takahashi, K. (2017). Design of Wall-Destructive but Membrane-Compatible Solvents. *J. Am. Chem. Soc.*, **139**(45):16052-16055.
30. Larghi, E., Kaufman, T. (2006). The Oxa-Pictet–Spengler Cyclization: Synthesis of Isochromans and Related Pyran-Type Heterocycles. *Synthesis*, **2**:187-220.
31. Lauby-Secretan, B., Scoccianti, C., Loomis, D., Grosse, Y., Bianchini, F., Straif, K. (2016). Body fatness and cancer-Viewpoint of the IARC working group. *N. Engl. J. Med.*, **375**:794-798.
32. Laurila, P., Wohlwend, M., Imamura de Lima, T., Luan, P., Herzig, S., Zanou, N., Crisol, B., Bou-Sleiman, M., Porcu, E., Gallart-Ayala, H., Handzlik, M. K., Wang, Q., Jain, S., D'Amico, D., Salonen, M., Metallo, C. M., Kutalik, Z., Eichmann, T. O., Place, N., Ivanisevic, J., Auwerx, J. (2022). Sphingolipids accumulate in aged muscle, and their reduction counteracts sarcopenia. *Nat. aging*, **2**:1159-1175.
33. Liamina, N., Kotel'nikova, E., Karpova, É., Biziaeva, E., Senchikhin, V., Lipchanskaia, T. (2014). Cardioprotective capabilities of drug meldonium in secondary prevention after percutaneous coronary intervention in patients with documented myocardial ischemia. *Kardiologia*, **54**:60-65.
34. Liang, Y. (2024). Impacts of Ketogenic and Mediterranean Diets on Obesity-Induced Type 2 Diabetes. *HSET*, **91**:344-348.

35. Liu, Y. (2006). Fatty acid oxidation is a dominant bioenergetic pathway in prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis.*, **9**(3):230-4.
36. Ma, L., Chen, C., Zhao, C., Li, T., Ma, L., Jiang, J., Duan, Z., Si, Q., Chuang, T. H., Xiang, R., & Luo, Y. (2024). Targeting carnitine palmitoyl transferase 1A (CPT1A) induces ferroptosis and synergizes with immunotherapy in lung cancer. *Sign. Transduct. Targ. Ther.*, **9**:64.
37. Maher, M., Diesch, J., Casquero, R., Buschbeck, M. (2018). Epigenetic-Transcriptional Regulation of Fatty Acid Metabolism and Its Alterations in Leukaemia. *Front. Genet.*, **9**:405.
38. Marquis, N., Fritz, I. (1964). Enzymological determination of free carnitine concentrations in rat tissues. *J Lipid Res.*, **5**:184-7.
39. Mazzini, V., Craig, V. (2017). What is the fundamental ion-specific series for anions and cations? Ion specificity in standard partial molar volumes of electrolytes and electrostriction in water and non-aqueous solvents. *Chem. Sci.*, **10**:3430-3433.
40. Miliovsky, M., Svinyarov, I., Mitrev, Y., Evstatieva, Y., Nikolova, D., Chochkova, M., Bogdanov, M. (2013). A novel one-pot synthesis and preliminary biological activity evaluation of cis-restricted polyhydroxy stilbenes incorporating protocatechuic acid and cinnamic acid fragments. *Eur. J. Med. Chem.*, **66**:185-192.
41. Miliovsky, M., Svinyarov, I., Prokopova, E., Batovska, D., Stoyanov, S., Bogdanov, M. (2015). Synthesis and Antioxidant Activity of Polyhydroxylated trans-Restricted 2-Arylcinnamic Acids. *Molecules*, **20**:2555-2575.
42. Monaco M. (2017). Fatty acid metabolism in breast cancer subtypes. *Oncotarget*, **8**:29487-29500.
43. Morillas, M., Gómez-Puertas, P., Roca, R., Serra, D., Asins, G., Valencia, A., Hegardt, F. (2004). Structural model of the catalytic core of carnitine palmitoyltransferase I and carnitine octanoyltransferase (COT): mutation of CPT I histidine 473 and alanine 381 and COT alanine 238 impairs the catalytic activity. *J. Biol. Chem.*, **276**(48):45001-8.
44. Mørkholt, A., Wiborg, O., Nieland, J. (2017). Blocking of carnitine palmitoyl transferase 1 potently reduces stress-induced depression in rat highlighting a pivotal role of lipid metabolism. *Sci. Rep.*, **7**:2158.
45. Morris, E., Edwards, C. (2018). Adipokines, adiposity, and bone marrow adipocytes: Dangerous accomplices in multiple myeloma. *J. Cell Physiol.* **233**:1-8.
46. Nechaeva, G., Zheltikova, E. (2015). Effects of Meldonium in early postmyocardial infarction period. *Kardiologija*, **55**:35-42.
47. Rahimi, Y., Camporez, J., Petersen, M., Pesta, D., Perry, R., Jurczak, M., Cline, G., Shulman, G. (2014). Genetic activation of pyruvate dehydrogenase alters oxidative substrate selection to induce skeletal muscle insulin resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **111**:16508-16513.
48. Ramsay, R., Gandour, R., van der Leij, F. (2001). Molecular enzymology of carnitine transfer and transport. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1546**(1):21-43.
49. Randle, P., Garland, P., Hales, C., Newsholme, E. (1963). The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet*, **1**:785-789.
50. Ruze, R., Liu, T., Zou, X., Song, J., Chen, Y., Xu, R., Yin, X., Xu, Q. (2023). Obesity and type 2 diabetes mellitus: connections in epidemiology, pathogenesis, and treatments. *Front. Endocrinol.*, **14**:1161521.
51. Szafran, M., Dega-Szafran, Z., Nowak-Wydra, B., Pietrzak, M. (2001). Differences in proton-proton coupling constants of N+—CH2—CH2 protons of some betaines, N+—(CH2)2—3—COO—, and their complexes in aqueous solution. *J. Mol. Struct.*, **563**:555-564.
52. Tars, K., Leitans, J., Kazaks, A., Zelencova, D., Liepinsh, E., Kuka, J., Makrecka, M., Lola, D., Andrianovs, V., Gustina, D., Grinberga, S., Liepinsh, E., Kalvinsh, I., Dambrova, M., Loza, E.,

- Pugovics, O. (2014). Targeting carnitine biosynthesis: discovery of new inhibitors against γ -butyrobetaine hydroxylase. *J. Med. Chem.*, **57**(6):2213-36.
53. Trabjerg, M., Andersen, D., Huntjens, P., Mørk, K., Warming, N., Kullab, U., Skjønnemand, M., Oklinski, M., Oklinski, K., Bolther, L., Kroese, L., Pritchard, C., Huijbers, I., Corthals, A., Søndergaard, M., Kjeldal, H., Pedersen, C., Nieland, J. (2023). Inhibition of carnitine palmitoyl-transferase 1 is a potential target in a mouse model of Parkinson's disease. *NPJ Parkinson's Dis.*, **9**:6.
54. Wakil, S., Abu-Elheiga, L. (2009). Fatty acid metabolism: target for metabolic syndrome. *J. Lipid Res.*, **50**:138-143.
55. Wang, M., Wang, K., Liao, X., Hu, H., Chen, L., Meng, L., Gao, W., Li, Q. (2021). Carnitine Palmitoyltransferase System: A New Target for Anti-Inflammatory and Anticancer Therapy? *Front. pharmacol.*, **12**:760581.
56. Wang, X., Yang, C., Huang, C., Wang, W. (2024a). Dysfunction of the carnitine cycle in tumor progression. *Heliyon*, **10**:e35961.
57. Yu, N., Rebecca, P., Tartar, A., Gesquiere, J. (1999). Cycloaddition of Homophthalic Anhydrides with Aldehydes and Ketones: a Route to 3,4-dihydroisocoumarin-4-carboxylic Acid Derivatives. *Tetrahedron*, **55**:13735-13740.
58. Zhang, Y., Cremer, P. (2006). Interactions between macromolecules and ions: The Hofmeister series. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **10**:658-663.
59. Zhu, Y., Wang, Y., Li, Y., Li, Z., Kong, W., Zhao, X., Chen, S., Yan, L., Wang, L., Tong, Y., Shao, Y. (2023). Carnitine palmitoyltransferase 1A promotes mitochondrial fission and regulates autophagy by enhancing MFF succinylation in ovarian cancer. *Commun. Biol.*, **6**:618.

Научни публикации по темата на дисертацията и изводи

1. S. Stoyanova, M. G. Bogdanov, Rational Design, Synthesis, and In Vitro Activity of Heterocyclic Gamma-Butyrobetaines as Potential Carnitine Acetyltransferase Inhibitors, *Molecules* **2025**, 30(3):735. (Q1)
2. S. Stoyanova, M. G. Bogdanov, Synthesis and Characterization of cis-/trans-(±)-3-Alkyl-3,4-dihydro-6,7-dimethoxy-1-oxo-1H-isochromene-4-carboxylic Acids, *Molbank* **2025**, 2025(2):M1988. (Q4)

Участия в научни форуми, на които са представени резултатите от изследванията

1. Студентска Научна Сесия по Органична Химия, 15-16 април 2022 г., Пловдив, България, Хетероциклени гама-бутиробетаини като потенциални метаболитни модулатори, С. Стоянова, М. Г. Богданов, презентация;
2. XX Национална Конференция по Химия за студенти и докторанти, 18-20 май 2022 г., София, България, Хетероциклени гама-бутиробетаини като потенциални метаболитни модулатори, С. Стоянова, М. Г. Богданов, презентация;
3. Осми Конгрес по Фармация с международно участие, 27-30 април 2023 г., к.к. Боровец, България, Хетероциклени гама-бутиробетаини като потенциални метаболитни модулатори, С. Стоянова, Милен Г. Богданов, презентация;
4. XXI Национална Конференция по Химия за студенти и докторанти, 17-19 май 2023 г., София, България, Хетероциклени гама-бутиробетаини като потенциални метаболитни модулатори – *in vivo* изследвания, С. Стоянова, Й. Глухчева, С. Стойкова, В. Атанасов, М. Г. Богданов, презентация;
5. 12-th Chemistry Conference (12CC), October 13-14 2023, Plovdiv, Bulgaria, Gamma-butyrobetaines as potential modulators of metabolic processes, S. Stoyanova, M. G. Bogdanov, poster;
6. 21st International Symposium on Solubility Phenomena and Related Equilibrium Processes, September 9-13 2024, Novi Sad, Serbia, *N*-methylimidazolium-based ionic liquids as potential modulators of metabolic processes, S. Stoyanova, M. G. Bogdanov, poster;
7. Научна сесия „Климентови дни“, 20-21 Ноември 2024 г., София, България, Хетероциклени гама-бутиробетаини като потенциални метаболитни модулатори, С. Стоянова, М. Г. Богданов, постер.