

## ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу Давлетшина Эльдара Валерьевича «Разработка новых противоопухолевых агентов «митоканов» на основе конъюгатов тритерпеновых кислот с митохондриотропным соединением F16», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.3. Органическая химия

### Актуальность темы исследования

Несмотря на достаточно большой арсенал средств, направленных на лечение опухолевых заболеваний, проблема их эффективности по многим причинам далека от своего хотя бы удовлетворительного решения. Это связано с тем, что большинство используемых химико-терапевтических подходов имеет существенные недостатки – низкую селективность по отношению к трансформированным клеткам, тяжелые побочные токсические эффекты, быстрое развитие резистентности к лекарственным субстанциям и др. Казалось бы, эти проблемы можно решить с применением таргетных соединений, обладающих высокой избирательностью действия по отношению к опухолевым клеткам. Сама по себе проблема таргетности по отношению к опухолевым клеткам не менее сложна, так как требует создания высокоэффективных средств доставки, декорированных векторными группами, направленными на наиболее экспрессирующие системы трансформированной клетки, отличающие ее от нормальной.

В последнее десятилетие было выяснено, что одну из ключевых ролей в возникновении и развитии многих, в том числе опухолевых, заболеваний играют митохондрии – клеточные органеллы, отвечающие за множество различных функций, особенно за энергетику клетки, являясь своего рода «электростанциями» клетки, синтезирующими высокоэнергетические молекулы АТФ. Митохондрии опухолевых клеток имеют существенно более отрицательный мембранный потенциал по сравнению с нормальными клетками, что позволяет создавать лекарственные вещества – митоканы, направленные на их уничтожение через рассогласование дыхания и фосфорилирования с последующим необратимым апоптозом. Среди векторных групп, позволяющих лекарственным субстанциям легко преодолевать клеточные и митохондриальные мембраны, особенно хорошо себя зарекомендовали липофильные делокализованные триарилфосфониевые катионы, а также иминиевые катионы, полученные как из синтетических, так и природных азотсодержащих гетероциклов. Катионы последнего типа кроме всего прочего позволяют еще и визуализировать распределение лекарственных субстанций в клетке методом конфокальной микроскопии с использованием флуоресценции.

Природные соединения, в частности тритерпенового ряда, обладают выраженной противоопухолевой активностью, но очень низкой селективностью. Объединение в одной структуре терапевтического тритерпенового фрагмента с митохондриально ориентирующим векторным фрагментом на основе новой недавно предложенной в литературе N-гетероциклической катионной молекулы иодида (*E*)-4(1*H*-индол-3-илвинил)-*N*-метилпиридиния (F16) является очень своевременным и актуальным. Решение этой синтетической задачи органической и медицинской химии для очень сложных, полифункциональных, способных к самоорганизации молекул тритерпеноидов положено в основу представленной диссертации.

В связи со сказанным, представленное к защите исследование является актуальным и целью работы, которую автор сформулировал как «Разработка эффективных синтетических подходов, рациональных методов синтеза и биологический скрининг «библиотеки» конъюгатов пентациклических тритерпеноидов лупанового, урсанового и олеанового ряда с делокализованным катионным соединением F16 в качестве противоопухолевых митохондриально-тропных лекарственных агентов», представляется обоснованной и значимой. Среди круга задач, которые автор сформулировал для достижения этой цели, наиболее важными в плане органической химии представляются задачи, связанные с синтезом конъюгатов перечисленных тритерпеноидов а также их полигидроксилсодержащих аналогов – маслиновой и корозоловой кислот, и катиона (*E*)-4(1*H*-индол-3-илвинил)-*N*-пиридиния через различные алкильные или алкоксильные линкеры и различные положения молекул тритерпеноидов. Безусловно, значимой и важной является оценка противоопухолевых свойств полученных соединений.

### **Научная новизна работы**

В целом работа носит комплексный, междисциплинарный характер, связанный с решением проблем не только органической химии, но и химии природных соединений и медицинской химии. Среди новых результатов, полученных в этой работе, необходимо отметить следующие.

Автором разработаны оптимизированные методики синтеза большого числа новых гибридных молекул, включающих остатки тритерпеноидов лупанового, урсанового и олеанового ряда, а также фрагмента соединения F16 – митохондриотропного липофильного катионного вектора, который позволяет осуществлять визуализацию распределения вещества методом флуоресценции. Получены новые данные по влиянию природы линкера, связывающего тритерпеноидный фрагмент с катионной частью, на цитотоксическую активность полученных соединений. Для ковалентного связывания фрагмента F16 и тритерпеноида были использованы различные линкеры, связанные через С-2, С-3, С-28 и С-30 позиции с тритерпеновым остовом.

Предложен новый подход к получению потенциальных лекарственных агентов на основе тритерпеноидов, в частности, бетулиновой кислоты, содержащих в молекуле фрагмент BODIPY для визуализации, и митохондриально ориентирующий трифенилфосфониевый векторный фрагмент. Этот подход, основанный реакции кросс-сочетания по С-2-пропинильным производным бетулиновой кислоты с галоидными производными BODIPY, содержащими атом иода при С-2 или С-8 углеродах, позволяет сохранять важные для проявления биологической активности группы 3-ОН и 28-СООН в остатке бетулиновой кислоты.

Всего в работе синтезировано более тридцати новых сложных полифункциональных соединений, очень информативно представлены спектральные данные, подтверждающие их строение, приведены рисунки спектров.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Теоретическая значимость проведенного исследования заключается, прежде всего, в установлении стереохимических особенностей получения большого круга полифункциональных соединений тритерпеноидов лупанового, урсанового и олеанового ряда. Автором предложен стереоселективный синтез нового оксигенированного аналога бетулиновой кислоты и его конъюгата с фрагментом F16, содержащих 1 $\alpha$ ,2 $\beta$ ,3 $\beta$ -

полигидроксилированное кольцо А. Исходя из доступных урсоловой и олеаноловой кислот, предложен стереоселективный синтез маслиновой и корозоловой кислот, которые были далее объединены с (*E*)-4-(2-(1*H*-индол-3-ил)винил)пиридином в новые гибридные катионные соединения тритерпеновой природы.

Большое теоретическое и практическое значение имеет разработка методов и оптимизированных методик синтеза большого числа новых гибридных молекул тритерпеноидов, содержащих катионный фрагмент (*E*)-4(1*H*-индол-3-илвинил)пиридиния, а также оценка его влияния на цитотоксические свойства пентациклических тритерпеноидов. Так, показано, что такое объединение приводит к резкому усилению цитотоксичности на лейкозных опухолевых клеточных линиях, на линиях рака молочной железы и немелкоклеточного рака легких вплоть до наномолярного диапазона. По сравнению с исходными тритерпеноидами цитотоксичность увеличилась в 100-300 раз. Выявлены соединения-лидеры, для которых продемонстрированы заметные индексы селективности между опухолевыми лейкозными клетками и здоровыми фибробластами.

Очень ценными представляются результаты по визуализации распределения производных тритерпеноидов с F16 методом конфокальной микроскопии, подтверждающие митохондриальную локализацию полученных соединений. Для некоторых соединений проведена оценка образования активных форм кислорода (АФК) в митохондриях и установлено, что в ряде случаев происходит значительное увеличение уровня АФК. Установлено также, что полученные конъюгаты олеаноловой и урсоловой кислот значительно снижали эффективность окислительного фосфорилирования и уменьшали митохондриальный мембранный потенциал.

### **Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и рекомендаций**

Достоверность полученных результатов обеспечивается использованием современных физических методов исследования – одномерной ( $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$ ), гомо- (COSY, NOESY) и гетероядерной (HSQC, HMBC) спектроскопии ЯМР, ИК спектроскопии, масс-спектрометрии МАЛДИ. Исследования цитотоксической активности конъюгатов были проведены с использованием МТТ-тестов и метода проточной цитофлуорометрии. Митохондриальная локализация соединений была исследована с использованием конфокальной микроскопии. Сопоставление полученных данных с имеющимися в литературе и подробная интерпретация экспериментальных наблюдений с использованием различных современных методов также определяют достоверность полученных результатов и обоснованность сделанных выводов.

### **Оценка содержания диссертации, ее завершенность в целом**

Диссертационное исследование представлено в классическом стиле: оно состоит из введения, трех глав, выводов, списка литературы и приложения спектров соединений. Во введении логично и последовательно обоснованы актуальность работы, цель исследования, новизна полученных результатов и основные положения, выносимые на защиту.

В первой главе представлен литературный обзор на тему «Конъюгаты биологически активных веществ с липофильными митохондриально-направленными катионными соединениями для избирательного воздействия на митохондрии раковых клеток», занимающий 31 стр. текста и цитирующий 136 литературных источников. В обзоре подроб-

но проанализированы получение и свойства митоканов различной природы, взаимосвязь структуры и биологических свойств и сделано заключение о перспективности предстоящей работы по получению конъюгатов тритерпеноидов с пиридиновым катионным фрагментом F16. Обзор написан достаточно строгим научным языком, по сути, и оставляет очень хорошее впечатление о глубокой проработке предмета исследований.

Во второй главе (обсуждение результатов) представлен анализ и обсуждение собственных результатов, очень органично сочетающихся с сопоставлением с дополнительными литературными данными. Он состоит из трех разделов, посвященных синтезу и исследованиям цитотоксической активности конъюгатов тритерпеноидов лупановой, олеановой и урсановой структуры с катионным фрагментом F16, анализу внутриклеточного распределения F16-конъюгатов тритерпеновых кислот и сравнению с их трифенилфосфониевыми производными методом конфокальной микроскопии.

В третьей главе дано подробное описание методик синтеза и спектральных характеристик полученных соединений. Заслуживает похвалы высокое качество приведенных в приложении рисунков спектров полученных соединений, имеющих большое справочное значение.

Представленные выводы являются обоснованными и базируются на большом авторском экспериментальном материале.

### **Подтверждение соответствия публикаций и автореферата основным положениям диссертации**

Основные результаты диссертационной работы отражены в 19 публикациях, из которых 9 работ относятся к журналам Перечня ВАК и индексируемых в системах Scopus и Web of Science, а также материалах 9 тезисов конференций, симпозиумов, семинаров и 1 патенте РФ. Автореферат и опубликованные работы полностью отражают содержание диссертации.

### **Вопросы и замечания по диссертационной работе**

В целом диссертационная работа Давлетшина Э.В. изложена достаточно подробно, строгим научным языком, логично построена, хорошо иллюстрирована рисунками и схемами, необходимость и последовательность всех этапов выполнения исследований четко аргументированы. Тем не менее, при прочтении текста работы возникли некоторые вопросы и замечания, которые в основном носят терминологический характер и характер неудачных выражений.

1) Представляется не вполне обоснованным в названии диссертации обозначение F16, допустимое в статьях, но не в квалификационной работе. Более правильным было бы привести полное название этого соединения или его катионной части – (E)-4(1H-индол-3-илвинил)-пиридиния, упростив название, скажем, до такой формулировки «Разработка новых митоканов на основе конъюгатов тритерпеновых кислот с (E)-4(1H-индол-3-илвинил)пиридином». Отметим, что название F16 в литературе кроме отмеченного производного еще относят к N-(1,3-диоксоизоиндолин-4-ил)-5-нитрофуран-2-карбоксамиду (A.Rathinavelu, K.Alhazzani, S.Dhandayuthapani, T.Kanagasabai. Tumor Biology. 2017, 1–12, Doi 10.1177/1010428317726841) и 5-(3-гидроксифенил)изотиазол-1,1,3(2H)-триону (см. <https://www.ebi.ac.uk/pdbe-srv/pdbechem/chemicalCompound/show/F16>), которые находят применение в биологии.

- 2) На протяжении всей диссертации, включая экспериментальную часть, автор пишет о спектрах ЯМР  $^{13}\text{C}$ , тогда как на самом деле используются исключительно спектры ЯМР  $^{13}\text{C} - \{^1\text{H}\}$ .
- 3) Неудачное выражение на стр. 52 «Сигналы атомов углерода С-2' и С-3' резонировали при...». Сигналы не могут резонировать, сигнал – это проявление резонанса, резонируют протоны или ядра углерода.
- 4) Желательно было бы обозначения клеточных линий привести в примечаниях к таблицам 1 и 2, а в самих таблицах ввести колонку с рассчитанными индексами селективности, что существенно бы упростило анализ полученных данных.
- 5) Приведенное на стр. 57, 61 и др. название «коросолевая кислота» представляется не вполне корректным. В русском варианте это *корозоловая* кислота.
- 6) В подписи к рис. 27 желательно было бы привести расшифровку M2 клеток (альтернативно активируемые интерлейкинами макрофаги, работа все-таки по химии)
- 7) На рис. 28 непонятно, что представлено по оси *y* на графике и в каких единицах. Следовало бы также написать значения по оси *x* по-русски.
- 8) Название BODYPY стр. 72 «боро-дифторо-дипирометен» следовало бы взять в кавычки, поскольку в русской номенклатуре название «метен» лишено всякого смысла. Лучше бы было дать его название по ИЮПАК – 4,4-дифтор-4-бора-3а,4а-диаза-*s*-индацен.

## Заключение

Приведенные замечания не снижают научной значимости выполненного диссертационного исследования и относятся к огрехам оформления. В целом диссертация Давлетшина Эльдара Валерьевича является завершенной научно-квалификационной работой, в которой представлены дизайн и новые синтетические подходы к получению полифункциональных соединений, содержащих в молекулах наряду с остатками пентациклических тритерпеноидов лупанового, урсанового и олеанового ряда фрагмент митохондриотропной катионной структуры – иодида (*E*)-4(1*H*-индол-3-илвинил)-*N*-метилпиридиния (F16), обладающих высокой противоопухолевой активностью. По своему содержанию, основным положениям, выносимым на защиту, и полученным научным результатам диссертация отвечает паспорту специальности 1.4.3. Органическая химия по направлениям исследований: п. 1. Выделение и очистка новых соединений; п. 3. Развитие рациональных путей синтеза сложных молекул; п. 7. Выявление закономерностей типа «структура – свойство»; п. 10. Исследование стереохимических закономерностей химических реакций и органических соединений. В целом выполнено добротное, очень трудоемкое с экспериментальной точки зрения, исследование, потребовавшее от автора высокой квалификации исследователя в химии природных соединений, знаний методов физических исследований строения молекул и глубокого понимания вопросов медицинской химии и биологии.

Таким образом, диссертационная работа Давлетшина Эльдара Валерьевича «Разработка новых противоопухолевых агентов «митоканов» на основе конъюгатов тритерпеновых кислот с митохондриотропным соединением F16» по актуальности, научной новизне, практической значимости и достоверности результатов соответствует требованиям ВАК РФ, предъявляемым к кандидатским диссертациям п. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 № 842 (ред. от 26.09.2022), а ее автор – Давлетшин Эльдар Ва-

лерьевич – заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.3. Органическая химия.

Официальный оппонент, зав. лабораторией  
фосфорсодержащих аналогов природных соединений  
Института органической и физической химии им.  
А.Е.Арбузова – структурного подразделения ФГБУН  
«Федеральный исследовательский центр «Казанский  
научный центр Российской академии наук»»  
Член-корреспондент РАН (специальность 02.00.03  
– Органическая химия), доктор химических наук,  
профессор, Миронов Владимир Федорович  
15 мая 2024 г.

Почтовый адрес: 420088, Казань, ул. Арбузова,  
д. 8, ИОФХ ФИЦ КазНЦ РАН  
Телефон: 8-843-2727384  
Адрес электронной почты: mironov@iorc.ru

Подпись Миронова В.Ф. заверяю.  
Главный ученый секретарь ФИЦ КазНЦ РАН,  
к.х.н.



Зиганшина С.А.