

ОТЗЫВ

официального оппонента Ямансарова Эмиля Юлаевича
на диссертацию Давлетшина Эльдара Валерьевича
«Разработка новых противоопухолевых агентов «Митоканов» на основе конъюгатов
тритерпеновых кислот с митохондриотропным соединением F16»,
представленной на соискание ученой степени кандидата химических наук
по специальности 1.4.3. Органическая химия

Актуальность темы выполненной работы.

Пентациклические тритерпеноиды лупанового, урсанового и олеананового рядов используются в качестве платформ для синтеза новых и эффективных терапевтических агентов. Интерес к данным соединениям обусловлен в первую очередь их высокой биосовместимостью, низкой системной токсичностью в отношении здоровых клеток и органов, возможностью внедрения разнообразных фармакологических свойств за счет простой химической трансформации структуры. Как правило это функционализация имеющихся реакционных групп, либо изменение структуры природного углеродного скелета. Другим развивающимся направлением считается синтез конъюгированных соединений, который заключается в сочленении тритерпеноидов с другими самостоятельными фармакологически-активными молекулами через фрагмент-линкер. Подобные исследования проводятся и для получения таргетных агентов на основе природных соединений, направленных на определенную биологическую мишень. Именно такой подход использован Давлетшиным Э.В. при выполнении диссертационной работы. В данном случае мишенью выступают клеточные органеллы – митохондрии. Основой диссертационной работы стала идея сочетания в одной структуре митохондриально-тропного агента F16 (адресная молекула-«вектор») и природных тритерпеноидов (цитотоксические молекулы-«эффекторы»), что должно привести к усилению фармакологических эффектов двух платформ. Подобное исследование особенно перспективно для создания потенциальных противоопухолевых молекул за счёт разницы между трансмембранными потенциалами митохондрий в опухолевых и здоровых клетках. Таким образом, диссертационная работа Давлетшина Э.В., направленная на поиск перспективных противоопухолевых агентов среди новых конъюгированных тритерпеноидов с адресным митохондриально-направленным механизмом действия является актуальной.

Научная новизна и практическая значимость результатов.

Синтезированы новые цитотоксические митохондриально-направленные гибриды природных тритерпеноидов и производного индола F16. Впервые проведено систематическое исследование их биологической активности с выявлением уровня и селективности цитотоксичности, потенциального механизма действия, адресных свойств и внутриклеточного проникновения и распределения. Проведен анализ влияния структуры соединений на их активность (тип и место сочленения, структура линкера, влияние типа и количества функциональных групп и липофильных катионных остатков). Продемонстрирован синергетический эффект остатка катионного соединения F16 и тритерпенового остова. Полученные производные представляют несомненный интерес для их последующей оптимизации методами медицинской химии и практической разработки в качестве потенциальных противоопухолевых агентов. Существенный интерес, на мой взгляд, могут представлять амфифильные конъюгаты структурного типа «тритерпеноид-этиленгликолевый линкер-F16».

Важно, что по итогам работы выявлены соединения-лидеры среди описанной библиотеки конъюгатов, для которых внутриклеточно и на уровне изолированных органелл определены митохондриально-тропные свойства, что является критически важным фактором для исследования и разработки адресных молекул или систем адресной доставки.

Диссертант достоверно продемонстрировал перспективность применяемого подхода сочетания выбранных объектов исследования, что может найти отражение и в последующих поисковых работах. Разработаны эффективные методы синтеза новых конъюгатов, которые являются перспективной адресной (митохондриально-направленной) платформой для создания новых терапевтических агентов с уникальным механизмом противоопухолевого действия.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, их достоверность.

Диссертационная работа изложена на 179 страницах, содержит 18 схем, 31 рисунок, 3 таблицы и состоит из введения, трех глав, заключения, выводов, списка сокращений и терминов, списка цитируемой литературы из 190 наименований, и 1 приложения, представляющего собой копии 60 спектров ЯМР синтезированных соединений.

Детально структурированный и хорошо изложенный литературный обзор (стр. 13-43) посвящен анализу (137 ссылок) современных методов и подходов к получению конъюгированных адресных систем направленного транспорта веществ в митохондрии, в

которых липофильные катионные органические соединения выступают в качестве транспортного вектора молекул для биологически активных (цитотоксических) соединений. В обзоре рассмотрены примеры известных делокализованных митохондриально-нацеленных катионов, таких как родамин 123, трифенилфосфоний катион, F16 и другие. Приведены примеры создания антиоксидантных препаратов на их основе, т.к. данное практическое приложение является основным для подобных соединений. Далее проводится подробный обзор современного состояния исследований в области разработки целевых для диссертации препаратов-«митоканов» на основе: действующих противоопухолевых лекарственных средств (доксорубицин, цисплатин, и др.); разнообразных природных соединений (куркумин, галловая кислота, и др.); терпенов (тритерпеноидов, различных стероидов). В общей сложности проанализированы данные более чем по 50 соединениям, глубина охвата литературы с 1969 года по 2023 год с основным упором на данные из источников, опубликованных в 2010-2020-х гг. В результате проведенного обзора литературы показано, что конъюгаты цитотоксических соединений с митохондриально-нацеленными молекулами-векторами позволяет селективно воздействовать на опухолевые клетки за счёт биохимических особенностей их митохондрий с минимальным воздействием на здоровые клетки. Продемонстрирована актуальность выбранного направления исследования по изучению конъюгатов производных пентациклических тритерпеноидов с липофильным катионом нового поколения F16.

Для выполнения экспериментальной части исследования в качестве объектов исследования выбраны природные тритерпеноиды – бетулин, бетулиновая, олеаноловая, урсоловая, глицирретовая кислоты и их полигидроксилированные производные (маслиновая, коросолевая и азиатиковая и др. кислоты). Для направленного транспорта конечных конъюгатов в митохондрии в работе использовано катионное соединение на основе индола F16.

Обсуждение результатов диссертации изложено на 34 страницах (стр. 44-78) и содержит в себе 3 раздела. В первом разделе второй главы описан синтез производного F16, которое затем было конъюгировано с различными бромпроизводными бетулина и бетулиновой кислоты через положения C-30 углеродного скелета или с помощью функционализации 3-ОН/28-СООН групп. С этой целью использованы простые реакции ацилирования, бромирования, нуклеофильного замещения и гидрофобные и гидрофильные линкеры. Затем аналогичные превращения осуществили на примере урсоловой, олеаноловой и глицирретовой кислот. Более того из-за предположения о

лабильности сложноэфирной группы во внутриклеточных условиях, дополнительно был осуществлен синтез конъюгатов на основе полусинтетических алкинов тритерпеноидов в положении С-2 с использованием реакции кросс-сочетания по Соногашира, для чего первоначально были получены реакцией Ульмана-Гольдберга N-замещенные индолы с арилгалогенидной функцией. При выполнении последнего синтеза авторы показали инертность производных F16 с бромфенильным фрагментом, в то время как йодфенильное производное формировало С-С связь с тритерпеновым терминальным алкином в условиях металло-комплексного катализа (выход конечного продукта 71%). В результате было синтезировано и охарактеризовано комплексом физико-химических методов 11 конъюгатов структурного типа «тритерпеноид-F16» или «тритерпеноид-линкер-F16» (рисунок 19, стр. 52). Полученные соединения были изучены на предмет цитотоксической активности *in vitro* против панели из четырех клеточных линий: трех линий лейкозных опухолевых клеток и одной линии здоровых фибробластов. Определено, что значение цитотоксичности соединений варьируется в зависимости от положения остатка F16 в структуре тритерпеноида. Большинство конъюгатов проявило активность выше исходных природных платформ. При этом наличие двух остатков F16 в структуре не привело к увеличению активности. В качестве соединения-лидера выбрано соединение **18**, состоящее из остатков F16 и бетулиновой кислоты, соединенных между собой триэтиленгликолевым линкером. Для данного соединения, значительно превзошедшего исходную бетулиновую кислоту по уровню цитотоксичности, выявлено антипролиферативное действие против клеточных линий рака молочной железы и фибробластов методом проточной цитометрии.

Во втором разделе Обсуждения результатов Давлетшин Э.В. расширил диапазон исходных соединений и использовал в аналогичных превращениях полигидроксилированные производные тритерпеноидов. Маслиновая и коросолевая кислоты были синтезированы в несколько стадий из природных тритерпеновых кислот, в то же время азитиаквая кислоты использовалась в виде коммерчески доступного реагента. Показано предпочтительное использование м-хлорнадбензойной кислоты в качестве стереоспецифичного гидроксилирующего фрагмента. Оптимизирована стереоселективность стадии восстановления кетофункции с применением солей церия (III). Конъюгаты полигидроксикислот диссертант получал по схеме через функционализацию карбоксильной функции коротким гидрофобным линкером с последующим взаимодействием промежуточного синтона с F16 с образованием соответствующих катионов **50**, **51** и **54**. Кроме того были получены интересные примеры

полусинтетических полигидроксипроизводных тритерпеноидов при помощи цепочки превращений из 3-кетопроизводного в енон, далее стереоселективное эпоксирирование и раскрытие эпоксидного цикла. В результате выполнения многостадийной схемы синтеза библиотека конъюгатов-митоканов пополнилась двумя ранее неизвестными соединениями **63** и **67**, несущими в себе необычный полигидроксилированный цикл А. Из всех описанных во втором разделе соединений только **50** и **51** были изучены на цитотоксичность *in vitro* против четырех линий карцином (легкого и молочной железы) в сравнении со здоровыми фибробластами. Эксперимент был осуществлен одновременно и с классическими «моногидроксилированными» конъюгатами **24** и **28**. Анализ полученных результатов продемонстрировал снижение уровня цитотоксичности за счет присутствия дополнительной гидроксильной функции в положениях С-2, что оказалось неожиданным результатом. С помощью метода проточной цитометрии выявлено прооксидантное действие соединений **24** и **28** с индукцией повышенного образования внутриклеточных форм АФК, в сравнении с природными тритерпенами. Данный факт свидетельствует в пользу влияния фрагмента F16 на уровень образования АФК. Также в отдельном эксперименте показана дисфункция митохондрий из клеток печени крысы в присутствии конъюгатов **24** и **28**, что вероятнее всего связано с митохондриальной мембранотропной активностью.

В завершающем третьем разделе главы «Обсуждение результатов» Давлетшин Э.В. изучил методом конфокальной микроскопии внутриклеточное распределение *in vitro* исследуемой библиотеки конъюгатов «тритерпеноид-F16» в эндотелиальных клетках мыши на примере соединения **15**. В качестве контроля был использован флюоресцентно меченый бордипиррометеновым красителем конъюгат бетулиновой кислоты с трифенилфосфином **78**. С этой целью предварительно был получен флюорофор **69** и **72** с арилгалогенидной функцией, который затем был сочленен с тритерпеновым остовом через интересный и, в целом нехарактерный для конъюгации, метод кросс-сочетания по Соногашире. Анализ результатов микроскопии показал, что конъюгат «тритерпеноид-F16» после внутриклеточной интернализации преимущественно накапливался в митохондриях, в то время как конъюгат «тритерпеноид-трифенилфосфин», по-видимому, не смог проникнуть внутрь клеток в условиях эксперимента и был удален из внеклеточной среды на стадии отмывки, даже не «прилипнув» к клеточной мембране.

Последняя третья глава диссертации представляет собой экспериментальную часть с описанием всех методик, использованных для синтеза соединений, краткое описание биологических экспериментов, а также подробное описание всех спектральных и физико-

химических характеристик соединений на основе результатов комплексного анализа методами масс-спектрометрии, спектроскопии ЯМР ^1H и ^{13}C , в том числе с применением методик двумерной гомо- и гетероядерной корреляционной спектроскопии (COSY, NOESY, HMBC, HSQC), ИК-спектроскопии, элементного анализа. Стоит выделить тот факт, что для всех синтезированных соединений приведено полное соотнесение всех сигналов атомов водорода и углерода в спектрах ЯМР ^1H и ^{13}C . Кроме того, для каждого соединения в экспериментальной части приведена структура с полной нумерацией атомов, что очень удобно и информативно при изучении работы. В совокупности данные экспериментальной части позволяют провести достоверный и исчерпывающий анализ подлинности структуры и состава синтезированных производных тритерпеноидов.

Заключение (стр. 122) и выводы (стр. 123) соответствуют поставленным целям и задачам проделанной работы в полной мере.

Содержание автореферата соответствует содержанию диссертации.

Основные результаты автора полностью опубликованы в 9 статьях из списка ВАК, из которых 9 входят в международные базы цитирования Web of Science и Scopus; доложены на 9 Международных и Всероссийских конференциях в Уфе, Казани, Нижнем Новгороде, Новосибирске; также получен 1 патент на изобретение.

Диссертация и автореферат построены цельно и логично, изложены хорошим научным стилем, оформление выверенное и аккуратное. При прочтении работы возник ряд вопросов и замечаний.

Замечания по диссертационной работе

1. На странице 5 приведено утверждение, что «...ограниченное проникновение тритерпеновых кислот через клеточные мембраны, связанное с высокой гидрофобностью...» неверно, т.к. в данном случае липофильность природных терпенов наоборот способствует внутриклеточному проникновению, а также благоприятствует связыванию с белками крови, что дополнительно оказывает влияние на их распределение. Известно, что затруднения в терапевтическом применении тритерпеноидов и их производных связаны в первую очередь с особенностями фармакокинетического профиля, в частности с биодоступностью, распределением по органам и тканям, или излишне быстрым метаболизмом и выведением.

В противном случае желательно указать, какие именно мембраны подразумевались.

2. При описании биологической активности следует тщательно подходить к выбору термина противоопухолевая активность, который, как правило, применяется для соединений, изученных на животных моделях опухолей.

3. При исследовании цитотоксичности соединений, описанных в первом разделе обсуждения результатов (рис. 19, стр. 52) наиболее полные данные о влиянии структуры на активность были бы получены в случае синтеза и тестирования веществ со свободными гидроксильной и/или карбоксильной функцией в положениях С-3 и С-28 для всех структурных типов конъюгатов. Известно, что свободные кислородсодержащие функции могут оказать существенное влияние на проявляемый эффект, о чем диссертант и указал на стр. 47 в 1 предложении 1 абзаца. Также значительно усилило бы работу унификация ряда применяемых линкеров для различных типов тритерпеноидов с целью определения вклада структуры природной платформы на цитотоксичность.

4. В Таблице 1 и в обсуждении результатов на стр. 53 отсутствуют данные об отрицательном и положительном контроле в проведенных тестах, а также о времени инкубации исследуемых клеточных линий с тестируемыми соединениями, что позволило бы точнее провести оценку полученных результатов. Такие же замечания справедливы и для Таблицы 2 на стр. 69.

5. На стр. 54 первого раздела главы 2 никак не обсуждается возможное влияние гидрофильного линкера на проявленную активность соединения **18**, которое далее было выбрано в качестве соединения-лидера и по своей структуре должно быть амфифильным. Из литературных данных доподлинно известно, что наличие амфифильных свойств может значительным образом повлиять на цитотоксичность соединений. Интересно было бы узнать влияние использованного этиленгликолевого линкера на водорастворимость конъюгата **18** в сравнении с гидрофобным аналогом **15**.

6. На стр. 60 приведены литературные ссылки [170, 171] на методику бромирования с последующей обработкой щелочью. Данные ссылки следует привести и в Экспериментальной части на стр. 180.

7. В связи с тем, что в различных экспериментах по определению цитотоксичности и возможного механизма действия синтезированных соединений используются разнообразные клеточные линии (например, гематологических или солидных опухолей), то в обсуждении результатов необходимо привести рациональное объяснение сделанного при планировании биологических или фармакологических тестов выбора в пользу той или иной панели клеточных линий.

8. Описание рисунков 27-29 на стр. 70-72 составлено скудно и не позволяет быстро и в полной мере разобраться в приведенных результатах. Для этого необходимо привести больше исходных данных, например, как минимум, объяснение значений осей координат и использованных сокращений (если таковые отсутствуют в основном тексте обсуждения

результатов). Это сделать достаточно легко, взяв в качестве примера описание результатов аналогичных экспериментов в работах, опубликованных в профильных журналах первого или второго квартилей.

9. На стр. 70 использовано утверждение об образовании супероксидного радикала в качестве ключевой активной формы кислорода. Тем не менее, существуют и другие формы АФК и из приведенных объяснений неясно, на чем основан сделанный вывод.

10. На всех схемах и рисунках следовало отобразить ориентацию ключевых атомов водорода при атомах С-5, С-9, С-13 и С-18.

11. На странице 80 в описании литературных ссылок на синтез известных производных приведены не все номера соединений из диссертации, что вносит дополнительное затруднение при прочтении работы.

Безусловно, сделанные замечания не затрагивают сущности работы, достоверности полученных результатов, обоснованности выводов и не влияют на общую положительную оценку рецензируемой работы.

Заключение

Диссертационная работа Э.В. Давлетшина представляет собой качественное развитие научных работ в группе его руководителя Спивак Анны Юльевны по разработке таргетных митоканов на основе природных терпеноидов и является плодотворным продолжением проводимых в Уфимском федеральном исследовательском центре исследований по химической функционализации природных соединений и поиску среди них биологически активных и фармакологически ценных молекул-лидеров. Диссертация является актуальной, цельной, законченной научно-квалификационной работой, выполненной на высоком профессиональном уровне. По поставленным задачам, уровню их решения, объему и достоверности полученных данных, актуальности и новизне диссертация Э.В. Давлетшина отвечает требованиям, предъявляемым диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, изложенным в пп. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. №842.

Работа Э.В. Давлетшина содержит решение задач, имеющих важное значение для органической и медицинской химии природных соединений тритерпенового ряда и отвечает заявленной специальности 1.4.3. Органическая химия в части пункта 1 «Выделение и очистка новых соединений», пункта 3 «Развитие рациональных путей синтеза сложных молекул» и пункта 7 «Выявление закономерностей типа «структура –

свойство» паспорта специальности 1.4.3. Органическая химия, утвержденной приказом Министерства образования и науки РФ от 24 февраля 2021 г. N 118 (в ред. приказов Минобрнауки России от 27.09.2021 N 886, от 11.05.2022 N 445).

Давлетшин Эльдар Валерьевич заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.3. Органическая химия.

Официальный оппонент:

Эмиль Юлаевич Ямансаров

кандидат химических наук по специальности 02.00.03 – Органическая химия
заведующий лабораторией молекулярных гибридов
Института фундаментальной медицины
Федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего образования
«Башкирский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

Подпись Э.Ю. Ямансарова заверяю:

Ученый секретарь БГМУ
д.ф.н., проф.

Подпись:

Заверяю:

Ученый секретарь ФГБОУ ВО БГМУ
Минздрава России

С.А. Мещерякова



Почтовый адрес: 450008, Приволжский федеральный округ, Республика Башкортостан,
г. Уфа, ул. Ленина, д. 3

Телефон: 89871036091

Адрес электронной почты: euuyamansarov@bashgmu.ru

15 мая 2024 г.