

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.218.02, СОЗДАННОГО
НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО
НАУЧНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ УФИМСКОГО ФЕДЕРАЛЬНОГО
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО ЦЕНТРА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
МИНИСТЕРСТВА НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ
КАНДИДАТА НАУК**

аттестационное дело № _____
решение диссертационного совета от 05 июня 2024 г. № 128

О присуждении Давлетшину Эльдару Валерьевичу, гражданину Российской Федерации, ученой степени кандидата химических наук.

Диссертация «Разработка новых противоопухолевых агентов «митоканов» на основе конъюгатов тритерпеновых кислот с митохондриотропным соединением F16» в виде рукописи по специальности 1.4.3. Органическая химия принята к защите 27 марта 2024 г. (протокол заседания № 123) диссертационным советом 24.1.218.02, созданным на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (450054, г. Уфа, проспект Октября, 71; диссертационный совет создан в соответствии с приказом № 370/нк от 20 декабря 2018 г.).

Соискатель – Давлетшин Эльдар Валерьевич, 23 июня 1996 года рождения. В 2019 году соискатель окончил Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный университет» (БашГУ). В период подготовки диссертации с 01.10.2019г. по 29.09.2023г. соискатель Давлетшин Эльдар Валерьевич обучался в очной аспирантуре Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук. С 18 апреля 2022 года по настоящее время соискатель работает в должности младшего научного сотрудника лаборатории молекулярного дизайна и биологического скрининга веществ-кандидатов для фарминдустрии Института нефтехимии и катализа – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук.

Диссертация выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, в лаборатории органического синтеза Института нефтехимии и катализа – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук.

Научный руководитель – Спивак Анна Юльевна, кандидат химических наук (02.00.03 – Органическая химия), старший научный сотрудник лаборатории

органического синтеза Института нефтехимии и катализа – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук.

Официальные оппоненты:

Миронов Владимир Федорович – доктор химических наук (02.00.03 – Органическая химия), профессор (02.00.03 – Органическая химия), член-корреспондент РАН, заведующий лабораторией фосфорсодержащих аналогов природных соединений Института органической и физической химии им. А.Е. Арбузова – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Казанский научный центр Российской академии наук»;

Ямансаров Эмиль Юлаевич – кандидат химических наук (02.00.03 – Органическая химия), доцент, заведующий лабораторией молекулярных гибридов и конъюгатов Института фундаментальной медицины Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России

дали положительные отзывы на диссертацию.

В отзывах оппонентов указано, что диссертация Давлетшина Эльдара Валерьевича «Разработка новых противоопухолевых агентов «митоканов» на основе конъюгатов тритерпеновых кислот с митохондриотропным соединением F16» представляет собой законченное научное исследование, в котором на основании выполненных автором исследований решена важная задача в области органической химии: 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(1H-индол-3-илвинил)-N-метилпиридиния (F16), обладающих высокой противоопухолевой активностью, а также предложен новый подход к получению флуоресцентно-меченных тритерпеновых кислот, содержащих в молекуле фрагмент флуорофора BODIPY. Полученные соединения представляют значительный интерес в качестве биологически активных и лекарственных препаратов. Представленная работа по своей актуальности тематики, научной новизне, значению для науки и практики, объему и уровню соответствует требованиям пп. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г. (в действующей редакции), а её автор, Давлетшин Эльдар Валерьевич, заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.3. Органическая химия.

Ведущая организация Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Новосибирский институт органической химии имени Н.Н. Ворожцова» Сибирского отделения Российской академии наук (НИОХ СО РАН) (г. Новосибирск) в своем положительном отзыве, подписанном Шульц Эльвирой Эдуардовной, доктором

химических наук (02.00.03 – Органическая химия), профессором (02.00.03 – Органическая химия), заведующей лабораторией медицинской химии «Новосибирского института органической химии им. Н.Н. Ворожцова» Сибирского отделения Российской академии наук (НИОХ СО РАН), указала, что диссертационная работа Давлетшина Эльдара Валерьевича «Разработка новых противоопухолевых агентов «митоканов» на основе конъюгатов тритерпеновых кислот с митохондриотропным соединением F16» соответствует паспорту специальности 1.4.3. Органическая химия и представляет собой актуальную, логически завершенную научно-квалификационную работу, творческую и содержательную, вносит существенный вклад в химию природных соединений. В заключении отмечается, что диссертация соискателя Давлетшина Эльдара Валерьевича «Разработка новых противоопухолевых агентов «митоканов» на основе конъюгатов тритерпеновых кислот с митохондриотропным соединением F16» отвечает требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям и соответствует критериям, изложенным в пп. 9-14 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 (в действующей редакции), а ее автор, Давлетшин Эльдар Валерьевич, заслуживает присуждения учёной степени кандидата химических наук по специальности 1.4.3. Органическая химия.

Соискатель имеет **18** опубликованных работ, в том числе по теме диссертации **9** статей в научных рецензируемых изданиях, входящих в перечень рекомендованных ВАК РФ, Web of Science и Scopus, а также **9** тезисов докладов на научных конференциях, получен **1** патент РФ. В публикациях полностью освещены все основные аспекты диссертационной работы: представлены результаты анализа данных, полученных при проведении экспериментальных исследований. Все результаты, представленные на защиту, опубликованы в виде статей в рецензируемых научных журналах. В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени работах.

Наиболее значимые научные работы по теме диссертации:

1. Spivak, A.Yu. Pentacyclic triterpene acid conjugated with mitochondria-targeting cation F16: Synthesis and evaluation of cytotoxic activities / A.Yu. Spivak, D.A. Nedopekina, R.R. Gubaidullin, **E.V. Davletshin**, A.A. Tukhbatullin, V.A. D'yakonov, M.M. Yunusbaeva, L.U. Dzhemileva, U.M. Dzhemilev // Medicinal Chemistry Research. – 2021. – V. 30. – P. 940-951.
2. Dubinin, M.V. Mitochondria-targeted prooxidant effects of betulinic acid conjugated with delocalized lipophilic cation F16 / M.V. Dubinin, A.A. Semenova, A.I. Ilzorkina, N.V. Penkov, D.A. Nedopekina, V.A. Sharapov, E.I. Khoroshavina, **E.V. Davletshin**, N.V. Belosludtseva, A.Yu. Spivak, K.N. Belosludtsev // Free Radical Biology and Medicine. – 2021. – V. 168 – P. 55-69.
3. Spivak, A.Yu. Synthesis of BODIPY-labeled fluorescent betulinic acid derivatives with a terminal triphenylphosphonium group on side-chain C-28 / A.Yu. Spivak, **E.V.**

- Davletshin**, R.R. Gubaidullin, A.A. Tukhbatullin, D.A. Nedopekina // Chem. Nat. Compd. – 2022. – V. 58, № 6. – P. 1062-1068.
4. Belosludtsev, K.N. Comparative Study of Cytotoxic and Membranotropic Properties of Betulinic Acid-F16 Conjugate on Breast Adenocarcinoma Cells (MCF-7) and Primary Human Fibroblasts / K.N. Belosludtsev, A.I. Ilzorkina, N.V. Belosludtseva, V.A. Sharapov, N.V. Penkov, D.A. Serov, M.N. Karagyaur, D.A. Nedopekina, **E.V. Davletshin**, M.E. Solovieva, A.Yu. Spivak, U.S. Kuzmina, Yu.V. Vakhitova, V.S. Akatov and M.V. Dubinin // Biomedicines. – 2022. – V. 10. – P. 2903.
 5. Spivak, A.Yu. Synthesis and cytotoxic activity of the conjugate of an oxygenated betulinic acid analog with the delocalized lipophilic cationic compound F16 / A.Yu. Spivak, **E.V. Davletshin**, D.A. Nedopekina, R.R. Khalitova, Yu.P. Belsky, O.Yu. Shuvalov // Chem. Nat. Compd. – 2023. – V.59, №5. – P. 865-871.

На автореферат диссертации поступило 6 отзывов от:

д-ра хим. наук, профессора, заведующего кафедрой медицинской химии и тонкого органического синтеза химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова (МГУ) Милаевой Елены Рудольфовны и канд. хим. наук, старшего научного сотрудника кафедры медицинской химии и тонкого органического синтеза химического факультета, лаборатории биоэлементоорганической химии Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова (МГУ) Шпаковского Дмитрия Борисовича; канд. хим. наук, доцента кафедры органической и биоорганической химии института химии и защиты в чрезвычайных ситуациях Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Уфимский университет науки и технологий» (УУНиТ) Канчуриной Миннигуль Махамадьяновны; д-ра тех. наук, профессора, заведующего кафедрой физической и органической химии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Уфимский государственный нефтяной технический университет» (УГНТУ) Бадиковой Альбины Дарисовны; д-ра хим. наук, доцента, старшего научного сотрудника лаборатории биологически активных соединений «Института технической химии Уральского отделения РАН», филиала Федерального государственного бюджетного учреждения науки Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения РАН (ИТХ УрО РАН) Глушкова Владимира Александровича; д-ра хим. наук, профессора, главного научного сотрудника лаборатории фосфорсодержащих аналогов природных соединений Института органической и физической химии им. А.Е. Арбузова – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр РАН» (ИОФХ ФИЦ КазНЦ РАН) Катаева Владимира Евгеньевича; д-ра хим. наук, профессора, заведующего отделом органического синтеза «Института технической химии Уральского отделения РАН», филиала Федерального государственного бюджетного учреждения науки Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения РАН (ИТХ УрО РАН) Шкляева Юрия Владимировича.

В положительных отзывах имеются следующие вопросы, замечания и пожелания:

1. Почему в автореферате, хотя бы лаконично, не обсуждается механизм цитотоксического действия и митохондриальных дисфункций, инициированных конъюгатами «тритерпеноид-F16», тогда как результаты этих исследований отражены в нескольких работах по теме диссертации?

2. Было бы целесообразно оценить *in vitro* цитотоксичность F16-конъюгата азиатиковой кислоты **51**, а также деацетилированных F16-конъюгатов **58** и **62**.

3. Было бы целесообразно сравнить цитотоксичность синтезированных F16-конъюгатов не только с цитотоксичностью исходных тритерпеноидных кислот, но и с цитотоксичностью их ТФФ-конъюгатов, тем более, что ТФФ-конъюгаты бетулиновой и урсоловой кислот были впервые синтезированы и изучены в 2013 году также под руководством А.Ю.Спивак (научный руководитель настоящей диссертационной работы).

4. Красивые картинки на рис. 5 автореферата следовало бы более-менее подробно прокомментировать.

5. Поскольку в английских названиях кислот окончание **-oic** переводится как **-овая**, *corosolic acid* следует писать по-русски как коросолОвая кислота, а не коросолЕвая кислота.

Во всех отзывах отмечается актуальность, научная новизна, достоверность сделанных выводов, практическая значимость, а также соответствие требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, изложенным в пп. 9-14 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 (в действующей редакции), а также то, что автор диссертационной работы, Давлетшин Эльдар Валерьевич, заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.3. Органическая химия.

Выбор официальных оппонентов обосновывается тем, что доктор химических наук по специальности 02.00.03 – Органическая химия, профессор, член-корреспондент РАН, заведующий лабораторией фосфорсодержащих аналогов природных соединений Института органической и физической химии им. А.Е. Арбузова – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Казанский научный центр Российской академии наук» **Миронов Владимир Федорович** является ведущим специалистом в области органической и элементоорганической химии, связанной с проблемами синтеза, структуры и реакционной способности гетероциклических соединений, химии природных соединений. Соавтор свыше 260 научных публикаций в центральных российских и зарубежных журналах, в том числе 22 авторских свидетельств и патентов, 6 обзоров по приоритетным направлениям химической науки.

Кандидат химических наук по специальности 02.00.03 – Органическая химия, доцент, заведующий лабораторией молекулярных гибридов и конъюгатов Института фундаментальной медицины Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Башкирский государственный

медицинский университет» Минздрава России **Ямансаров Эмиль Юлаевич** является ведущим специалистом в области химии стероидов и природных тритерпеноидов, автор более 60 научных работ и 5 патентов, связанных с синтезом конъюгатов тритерпеноидов для направленной доставки в опухолевые клетки.

Выбор ведущей организации обоснован тем, что в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Новосибирский институт органической химии имени Н.Н. Ворожцова» Сибирского отделения Российской академии наук (НИОХ СО РАН) (г. Новосибирск) на высоком уровне проводятся исследования в области химии растительных метаболитов, изучение фармакологических свойств и механизма действия биологически активных агентов природного и синтетического происхождения.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

разработаны эффективные синтетические подходы и хеморациональные методы синтеза ранее неизвестных конъюгатов природных тритерпеновых кислот лупанового, урсанового и олеанового ряда с липофильным митохондриально-тропным катионным соединением F16, успешно использованным для усиления биодоступности и селективного накопления цитотоксических тритерпеноидов в митохондриях опухолевых клеток;

впервые предложен стереоселективный синтез не описанного ранее оксигенированного аналога бетулиновой кислоты и его конъюгата с F16, содержащих 1 α ,2 β ,3 β -полигидроксилированное кольцо А. При исследовании цитотоксической активности на клетках аденокарциномы легких конъюгат проявил значительно более выраженное противоопухолевое действие, по сравнению с исходным соединением, бетулиновой кислотой (бетулиновая кислота, IC₅₀ 34.5 μ M; конъюгат, IC₅₀ 6.3 μ M);

разработан новый подход к синтезу BODIPY-меченных проб производных бетулиновой кислоты, несущих в С-28 боковой цепи концевые митохондриально-направленные трифенилфосфониевые группы. Разработанный подход ковалентного связывания флуорофора BODIPY с бетулиновой кислотой, позволяющий сохранить в тритерпеновом ядре нативные 3-OH и 28-COOH функции, может найти применение в синтезе других флуоресцентных BODIPY-меченных тритерпеноидов;

установлены оптимальные условия 5-ти стадийного стереоселективного синтеза полигидроксилированных тритерпеноидов маслиновой и коросолевой кислот на основе доступных олеаноловой и урсоловой кислот. **Показана** возможность оптимизации условий заключительной стадии синтеза – восстановление 3-кетогруппы в 2 α -гидрокси-кетонах путем использования реагента Луше (NaBH₄, модифицированного CeCl₃ · 7H₂O);

показано значительное увеличение цитотоксического потенциала конъюгатов тритерпеновых кислот с молекулой F16 в отношении линий опухолевых клеток человека различного происхождения (опухолевые линии лейкозных клеток, карциномы и здоровые клетки фибробласты). Все синтезированные соединения проявили высокий противоопухолевый эффект на лейкозных клетках в субмикромольных

концентрациях с приемлемым «терапевтическим окном» ($IS=10$): гибридные молекулы превзошли природные тритерпеновые кислоты в 100-300 раз. Высокий синергетический эффект подтвердился также на исследованных линиях карцином;

установлено, что молекулярная структура тритерпенового ядра и позиция ковалентного связывания катионной молекулы с тритерпеноидом оказывают значительное влияние на противоопухолевую активность гибридной молекулы. В ряду конъюгатов лупановой, урсановой и олеановой структуры F16-производные лупановых тритерпеноидов были наиболее цитотоксичными и селективными соединениями. Введение второго катионного фрагмента F16 в молекулу тритерпеноида, конъюгация бетулиновой кислоты с F16 при C-30 позиции или увеличение количества гидроксильных групп в кольце А тритерпеновых кислот не дало положительного заметного изменения цитотоксической активности;

с использованием метода конфокальной флуоресцентной микроскопии **исследована** прямая визуализация внутриклеточного распределения F16-конъюгатов тритерпеновых кислот в эндотелиальных клетках мыши. **Показано**, что гибридные молекулы поглощаются клетками, и основным местом их накопления являются митохондрии.

В итоге получен новый тип митохондриально-направленных цитотоксических катионных производных природных тритерпеновых кислот в качестве потенциальных кандидатов в противоопухолевые лекарственные препараты. Новые гибридные молекулы продемонстрировали многократное усиление цитотоксической активности по сравнению со своими прототипами, природными тритерпеновыми кислотами. Методом конфокальной флуоресцентной микроскопии подтверждена их локализация в митохондриях эндотелиальных клеток мыши. Полученные результаты показали, что F16-производные природных тритерпеновых кислот представляют собой потенциальные противоопухолевые агенты митоканы, перспективные для дальнейших биологических исследований.

Теоретическая значимость исследования заключается в том, что впервые изучено влияние введения катионного фрагмента F16 в структуру пентациклических тритерпеновых кислот на проявляемые ими цитотоксические эффекты с целью установления перспектив применения полученных гибридных соединений в качестве потенциальных митохондриально-направленных противоопухолевых лекарственных средств. Разработаны рациональные подходы и оптимизированные методики синтеза большого числа новых гибридных молекул, включающих остатки тритерпеноидов лупанового, урсанового и олеанового ряда и митохондриотропного липофильного катионного вектора F16. Предложен новый подход к получению флуоресцентно-меченных тритерпеновых кислот, содержащих в молекуле фрагмент флуорофора BODIPY. Новые флуоресцентные производные тритерпеноидов могут быть востребованы при изучении их взаимодействия с молекулярными мишенями на клеточном и субклеточном уровне. Полученные в диссертационной работе результаты расширяют базу данных о возможности использования доступных из растительного сырья природных тритерпеноидов в качестве молекулярной основы для разработки

новых лекарственных агентов.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:

синтезированные автором таргетные митохондриально-направленные конъюгаты доступных тритерпеновых кислот могут быть использованы в разработке новых лекарственных средств, направленных на лечение многих социально-значимых заболеваний, связанных с митохондриальными дисфункциями, таких как онкология, ишемия, диабет и др.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что:

результаты экспериментальных работ однозначно подтверждены с помощью современных физико-химических методов исследования структур. Строение всех впервые полученных веществ доказано методами ЯМР-спектроскопии, ИК-спектроскопии, масс-спектрометрии, и элементного анализа. Выделение и очистка соединений осуществлялись методами экстракции, осаждения, колоночной хроматографии и перекристаллизации; результаты не противоречат имеющимся литературным данным, опубликованным в рецензируемых журналах;

идея работы базируется на соединении в одной молекуле цитотоксического тритерпенового фрагмента, проявляющего противоопухолевое действие, и фрагмента митохондриально-тропного флуоресцентного соединения F16 (4-(1H-индол-3-илвинил)пиридиния), способного усиливать перенос биологически активных соединений через клеточные мембраны с последующим субклеточным накоплением в митохондриях клеток за счет гиперполяризованного мембранного потенциала митохондрий и одновременно выполняющего роль флуоресцентного зонда;

использованы современные данные научных исследований по теме диссертации, опубликованные в рецензируемых научных изданиях, в том числе с применением современных систем сбора и обработки информации (электронные базы данных Scopus (Elsevier), Web of Science (Clarivate Analytics)).

Личный вклад соискателя состоит в поиске, анализе и обобщении научной литературы по теме диссертации; проведении научных экспериментов, подготовке полученных соединений к физико-химическим методам анализа и интерпретации полученных результатов; подготовке материалов к публикации в научных журналах; представлении результатов работы на конференциях.

В ходе защиты и обсуждения диссертации официальными оппонентами и членами диссертационного совета были высказаны следующие **критические замечания и вопросы:**

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}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-8-индацен.

9. 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.

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

11. 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.

12. 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.

13. 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**.

14. 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.

15. 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.

16. 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 кварталей.

17. 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.

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

19. 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.

20. Правильно я понял, что при аллильном бромировании изопропилиденовой группы в бетулине и бетулиновой кислоте, Вы использовали ацетильную защиту С-3/С-28 – гидроксильных групп? И второй вопрос, бромирование N-бромсукцинимидом

Вы проводили без использования дополнительного инициатора радикальной реакции и при этом получили продукты с хорошим выходом?

21. Прекурсор с бромфенильным заместителем в индольном фрагменте **33** по сравнению с йодфенильным аналогом **35** совсем не вовлекался в реакцию Соногашира и не давал продукта кросс-сочетания с пропаргильным производным **32** даже в следовых количествах?

22. В чем заключается эффект F16? Он увеличивает биодоступность тритерпенового соединения за счет усиления переноса молекулы через клеточные мембраны или F16 сам обладает цитотоксическим и прооксидантным действием?

23. Известны на сегодня противоопухолевые лекарства «митоканы», которые одобрены для использования в практической медицине?

24. В выводах написано, что в диссертации разработаны рациональные и стереоселективные методы синтеза. Как Вам удалось контролировать стереоселективность Ваших реакций?

25. Вы утверждаете, что у Вас происходит апоптотическая гибель раковых клеток за счет окислительного стресса и образования активных форм кислорода? В случае здоровых клеток Ваши конъюгаты также могут проявить прооксидантное действие и как этот эффект повлияет на здоровые клетки?

26. Известны ли сегодня в литературе конъюгаты F16 с другими противоопухолевыми соединениями?

27. Катионная молекула F16 содержит в качестве противоиона иодид-ион. А если в качестве противоиона использовать ионы брома, или хлора, это повлияет на биологическую активность F16?

28. Вы проводили конъюгацию тритерпеноидов с F16 путем кватернизации атома азота в пиридиновом кольце F16. Почему Вы выбрали именно этот путь, а не вводили тритерпеновый фрагмент, например, в индольное кольцо, или почему не связывали ядро тритерпеноида с углеродными атомами пиридинового цикла, не затрагивая пиридиновый атом азота?

29. Можете сказать, есть ли у Вас конкуренты в научном направлении, в котором Вы работаете, и в каких странах эта работа выполняется? На Ваши работы ссылаются?

Соискатель согласился с замечаниями 1-8, 14, 18, 19. На остальные ответил и привел собственную аргументацию (вопросы 9-13, 15-17, 20-29):

Ответ на вопрос 9: внутриклеточному проникновению препятствует как сильная гидрофильность, так и слишком высокая липофильность вещества, так как в этом случае вещество застревает в липидном бислое мембран и не поступает в цитозоль. Считается, что оптимальная величина липофильности LogP находится в интервале -1 до +5. Пентациклические тритерпеноиды бетулин, лупеол, бетулиновая кислота имеют $\text{LogP} \approx 7$, что указывает на их слабый пассивный перенос через клеточные мембраны. В экспериментах на искусственных монослойных липидах мембран было показано, что проникновение бетулиновой кислоты через мембраны составляет ниже 4% от используемой пробы, т.е. бетулиновая кислота имеет очень низкую

биодоступность, это мы и имели в виду, когда писали об усилении переноса через клеточные мембраны.

Ответ на вопрос 10: в научной литературе обсуждался вопрос, когда уместно использовать термин «цитотоксический», а когда «противоопухолевый». Буквально «цитотоксический» означает «токсичный для живых клеток», тогда как «противоопухолевый» означает «ингибирование или предотвращение развития новообразований». Термин «цитотоксичность» является обобщающим термином, включающим и разные типы токсинов, которые снижают нормальную жизнеспособность клеток. В результате пришли к мнению, что если биологически активное вещество или лекарство вызывает гибель опухолевых клеток *in vitro* / *in vivo*, то более корректно характеризовать его как противоопухолевое или противораковое соединение. Проще говоря, можно сказать, что препарат с противоопухолевой активностью обладает цитотоксичностью. Однако любой цитотоксический агент не обязательно обладает противоопухолевыми свойствами.

Ответ на вопрос 11: действительно, при варьировании, например, длины алканового линкера мы могли бы получить дополнительную интересную информацию. К сожалению, мы не располагали для этой работы необходимым ассортиментом реактивов. Поэтому мы использовали имеющийся у нас в наличии 1,4-дибромбутан и получали дибромид триэтиленгликоля, который также использовали в качестве линкера.

Ответ на вопрос 12: положительным контролем всегда служили исходные тритерпеновые кислоты и это отмечается в тексте обсуждения. Отрицательный контроль, т.е. растворитель, в нашем случае ДМСО, в статьях нашего профиля почти никогда не указывается. Время инкубации было стандартно – 48 часов, мы указываем его в экспериментальной части статьи. У рецензентов статей надписи к таблицам замечаний не вызывали, поэтому они в неизменном виде были приведены в диссертации.

Ответ на вопрос 13: триэтиленгликолевый линкер потенциально может улучшить растворимость конъюгата в воде по сравнению с другими гидрофобными полиалкановыми линкерами. Однако в нашем случае этот линкер использовался с учетом другого его свойства: известно, что линкеры с этиленгликолевыми единицами повышают проницаемость клеточных мембран и усиливают перенос веществ через мембраны.

Ответ на вопрос 15: в первичном скрининге на противоопухолевую активность мы не задавались целью сосредоточиться на каком-то определенном типе рака, а использовали клеточные культуры, которые были для нас доступны из Российской коллекции клеточных культур – это Институт цитологии РАН (г. Санкт-Петербург) и МГУ им. Ломоносова (г. Москва).

Ответ на вопрос 16: описание рисунков 27-29 в диссертации представлено скудно, поскольку этот биологический эксперимент выполнялся нашими соавторами биохимиками и эти результаты планируется представить в развернутом виде в другой диссертационной работе.

Ответ на вопрос 17: образование активных форм кислорода в данном исследовании было проведено с использованием метода проточной цитометрии, который позволяет зафиксировать образование лишь супероксид-аниона, остальные же АФК (H_2O_2 , OH^\bullet и др.) при использовании этого метода не фиксируются. Образование H_2O_2 было исследовано на изолированных митохондриях печени крыс.

Ответ на вопрос 20: в реакциях аллильного бромирования изопропилиденовой группы в бетулине или в бетулиновой кислоте мы действительно использовали ацетильную защиту C-3/C-28 – гидроксильных групп и бромирование N-бромсукцинимидом проводили без использования инициатора радикальной реакции. Целевые продукты получали в этих условиях с хорошим выходом.

Ответ на вопрос 21: по-видимому, бромфенильное производное F16 в реакцию Соногашира не вовлекалось, поскольку мы не обнаружили продукт кросс-сочетания даже в следовых количествах.

Ответ на вопрос 22: эффект F16 заключается в следующем: липофильная катионная молекула F16 аккумулируется в митохондриальном матриксе, что способствует раскрытию митохондриальной транспортной поры и приводит к нарушению митохондриально-транспортной цепи. В результате цитохром c из митохондрии проходит в цитозоль и инициирует апоптотический путь гибели клетки.

Ответ на вопрос 23: пока таких препаратов нет, все потенциальные кандидаты в лекарства находятся в стадии испытаний на клетках или проходят первые фазы доклинических испытаний на животных.

Ответ на вопрос 24: стереоселективность наших реакций определялась в основном жестким стереохимическим контролем со стороны метильной ангулярной группы при C-10 атоме тритерпенового ядра. Анализ стереоселективности продуктов контролировали по одномерным спектрам ЯМР ^1H , в которых протон при C-3 отображался характерным дублетом с константой спин-спинового взаимодействия 9 Гц. В случае $3\alpha\text{-OH}$ эта константа была равна 2 Гц, что свидетельствовало о цис-конфигурации протонов при C-2 и C-3 позициях.

Ответ на вопрос 25: на здоровые клетки окислительный стресс действует меньше, потому что митохондрии раковых клеток имеют более отрицательный заряд и поэтому наши соединения локализуются в основном в митохондриях именно раковых клеток. Но окислительный стресс в здоровых клетках возможен, но это если совсем нет селективности, как в конъюгатах с бетулиновой кислотой в отношении клеточной линии MCF-7.

Ответ на вопрос 26: само соединение F16 в качестве средства доставки мало изучено. Известны были работы только о конъюгатах с 5-фторурацилом и хлорамбуцилом, но они пока проходят клинические испытания.

Ответ на вопрос 27: нет, противоион может быть любой: и бром, и йод. Противоион в конъюгатах значительной роли не играет и обычно в литературе он не указывается, это просто мы его указываем, как химики.

Ответ на вопрос 28: мы уже проводили конъюгацию F16 по индольному кольцу с бетулиновой кислотой, но он не показал значительной противоопухолевой

активности. Мы пока получали и испытывали только конъюгаты с F16 связанные по пиридиновому кольцу, но в дальнейшем мы будем рассматривать модификации структуры самой молекулы F16 и варьировать положения тритерпенового скелета.

Ответ на вопрос 29: Зук (Csuk) из Германии. Он исследует конъюгаты тритерпеновых кислот, но уже с родамином Б. Помимо тритерпеновых кислот, он также исследует желчные кислоты и различные стероиды. Эти конъюгаты показали высокую противоопухолевую активность. Родамин Б, как и F16, является флуоресцентным маркером. Да, на наши работы он ссылается.

Диссертационная работа Давлетшина Эльдара Валерьевича «Разработка новых противоопухолевых агентов «митоканов» на основе конъюгатов тритерпеновых кислот с митохондриотропным соединением F16» полностью соответствует критериям, содержащимся в пп. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 (в действующей редакции).

На заседании 05 июня 2024 г. диссертационный совет принял следующее решение: за решение задачи по разработке эффективных синтетических подходов, хеморациональных 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, имеющей важное научное и практическое значение для решения ряда фундаментально-прикладных проблем органической химии, присудить Давлетшину Эльдару Валерьевичу ученую степень кандидата химических наук по научной специальности 1.4.3. Органическая химия (Химические науки).

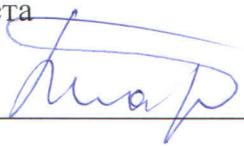
При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 16 человек, из них 6 докторов наук по профилю защищаемой специальности (1.4.3. Органическая химия), участвовавших в заседании, из 20 человек, входящих в состав совета, дополнительно введены на разовую защиту 0 человек, проголосовали: за – 16, против – нет, воздержавшихся – нет, недействительных бюллетеней – нет.

Председатель диссертационного совета
24.1.218.02, д-р хим. наук, профессор



 / Хурсан Сергей Леонидович

Ученый секретарь диссертационного совета
24.1.218.02, д-р хим. наук, профессор

 / Шарипов Глюс Лябибович

05 июня 2024 г.