

ОТЗЫВ официального оппонента

о диссертации на соискание ученой степени кандидата химических наук Гука Дмитрия Александровича на тему: «Медьсодержащие производные тиогидантоинов и их конъюгаты с редокс-активными группировками» по специальностям 02.00.03 – «Органическая химия» и 02.00.08 – «Химия элементоорганических соединений».

Актуальность работы. Противоопухолевые препараты, содержащие в своем составе ионы металлов, играют важную роль в химиотерапии при лечении опухолей. Препарат Циспластин на основе платины до сих пор является одним из наиболее эффективных препаратов для лечения некоторых типов онкологических заболеваний. Однако у практически любого медицинского препарата существуют побочные эффекты. Есть они и у «платиновых препаратов» (нефротоксичность, нейротоксичность, ототоксичность, отсутствие естественных механизмов выведения этого металла из организма). Поэтому внимание исследователей сосредоточено не на модификации соединений платины, а на поиске новых цитотоксичных координационных соединений биогенных переходных металлов, которые должны обладать меньшей общей токсичностью и легче выводиться из организма. Целью работы было создание методов синтеза новых координационных соединений меди (+1) и (+2), а также биметаллических координационных соединений Fe/Cu, с высокой цитотоксичностью по отношению к клеточным линиям злокачественных новообразований. Данные соединения фактически являются потенциальными препаратами для лечения различных опухолей. Актуальность работы не вызывает никаких сомнений, что подтверждается публикациями диссертационного материала в высокорейтинговых изданиях по органической и медицинской химии.

Общая структура работы. Работа состоит из шести частей: введения, обзора литературы на тему «Координационные соединения биогенных металлов как цитотоксические агенты для терапии злокачественных

новообразований», обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 245 листах машинописного текста, содержит 41 схему, 75 рисунков и 32 таблицы. Список цитируемой литературы включает 236 наименований.

Литературный обзор составляет 78 страниц, содержит 180 ссылок. Литературные данные сгруппированы в разделы, каждый из которых посвящен анализу научных публикаций последних 10 лет о координационных соединениях конкретного металла, обладающих доказанной противоопухолевой активностью. Среди биогенных металлов, перспективных для разработки противоопухолевых препаратов и цитотоксических агентов, могут быть выделены цинк, железо, кобальт и медь - важные микроэлементы, присутствующие в норме в организме человека и потенциально способные заменить составляющие основу цитотоксической терапии препараты платины. При чтении литературного обзора создается впечатление, что соискатель собрал исчерпывающий материал по цитотоксичным комплексам четырех металлов за 10 лет. В обзоре подробно описаны структурные особенности координационных соединений цинка (+2), железа (+2) и (+3), кобальта (+2) и (+3), меди (+1) и (+2). Прослежены закономерности влияния геометрии координационной сферы, степени окисления металла в комплексе и его окислительно-восстановительного потенциала на механизм цитотоксического действия и цитотоксическую активность. Из литературного обзора соискателем сделан основной вывод, что можно проводить «тонкую настройку» не только цитотоксичности, но и механизма противоопухолевого действия координационного соединения, меняя структуру, геометрию и электронные характеристики органического лиганда. Изменение структуры лиганда или замена его на ближайший гомолог может заметно изменить не только цитотоксичность координационного соединения, но и механизм связывания с ДНК, а в некоторых случаях и сделать основным другой механизм цитотоксического действия. Это в свою очередь открывает

возможность поиска и оптимизации новых поколений препаратов для терапии злокачественных новообразований.

Обсуждение результатов изложено на 83 страницах. Целью работы было создание методов синтеза новых координационных соединений меди (+1) и (+2), а также биметаллических координационных соединений Fe/Cu, с высокой цитотоксичностью по отношению к клеточным линиям злокачественных новообразований. Фактически работа была разбита на решение отдельных задач: 1) синтез лигандов и конъюгатов; 2) получение координационных соединений; 3) характеристика и изучение свойств полученных комплексов; 4) изучение биологической активности синтезированных координационных соединений.

Синтез лигандов. Диссертантом был осуществлен ретросинтетический анализ получения трех типов 5-пиридилметилден-2-тиоимидазол-4-оновых лигандов. Был выбран метод, в котором исходные синтоны являлись коммерчески доступными соединениями: аминами и этилизотиоцианатоацетат. Было получено 30 3-арил-2-тиогидантоинов, содержащих как донорные, так и акцепторные заместители в ароматическом ядре. Среди них получены соединения с *орто*-, *мета*- и *пара*-замещением, а также ди- и тризамещением в ароматическом кольце. Особо следует отметить, что четыре лиганда с акцепторными заместителями в ароматике получались в следовых количествах. Для их получения диссертантом был разработан альтернативный метод синтеза. Второй и третий тип лигандов был получен алкилированием метилиодидом и сшивкой 1,2-дибромэтаном лигандов первого типа. Всего получено 74 новых лиганда.

Отдельной частью исследования была «сборка» более сложных редокс-активных органических лигандов или конъюгатов, потенциально способных принимать участие в окислительно-восстановительных реакциях с ионами меди непосредственно в опухолевых клетках. Данные конъюгаты содержат медьхелатирующий фрагмент, редокс-активный фрагмент и соединяющий их линкер. Синтез таких гибридных молекул гораздо более трудоемкий.

Используя широкий спектр синтетических методов авторы успешно справились с данной задачей. Были задействованы конденсации, нуклеофильное замещение, алкилирование, клик-реакция азид-алкинового циклоприсоединения и другие методы. Конъюгаты с 1,2,3-триазольным линкером оказались очень чувствительными и потребовали тщательного подбора условий проведения клик-реакции. Гук Д.А. нашел оригинальное решение данной проблемы, оптимизировав методику. Была использована двухфазная система. Реагенты растворяли в хлористом метиле, а ионы $\text{Cu}(+1)$ генерировали *in situ* взаимодействием $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ и аскорбата натрия в минимальном количестве воды (3-4 капли). В качестве редокс-активного фрагмента были использованы менадион, нитроимидазол, ферроцен. Синтезировано 16 конъюгатов.

Координационные соединения обычно получали смешиванием растворов лиганда и солей меди (2). В работе было установлено, что в ряде случаев при замене растворителей происходят значительные изменения в продуктах реакции. Данные факты были зафиксированы диссертантом и тщательно изучены. Синтезировано 88 новых координационных соединений. Значительное место в диссертационном исследовании занимает изучение свойств и механизма комплексообразования лигандов с солями меди. Данная задача была решена с использованием мощного арсенала классических и современных аналитических методов. Используя методы рентгеноструктурного анализа, XANES спектроскопии, электронного парамагнитного резонанса, ЯМР, ИК и оптической спектроскопии, масс-спектрометрии, мониторинг точного масс в реальном времени, циклической вольтамперометрии, были установлены структурные особенности полученных соединений, степени окисления меди и железа в каждом комплексе, тщательно (постадийно) изучены механизмы образования того или иного координационного соединения.

Важнейшей частью диссертационного исследования стало изучение биологической активности. Были проведены масштабные исследования. Все

полученные в работе органические лиганды и координационные соединения на их основе были протестированы в качестве цитотоксических агентов на четырех клеточных линиях различного происхождения: MCF-7 (аденокарцинома молочной железы), A-549 (аденокарцинома легкого), HEK-293 (эмбриональная почка человека) и Va-13 (делящиеся клетки эмбрионального легкого человека). На основании полученных данных Гук Д.А. сформулировал некоторые критерии зависимости структура. Практически во всех случаях цитотоксичность координационных соединений во много раз превышает цитотоксичность соответствующих лигандов. Увеличение электроноакцепторной способности лиганда вызывает увеличение потенциала восстановления меди, что способствует стабилизации координационного соединения с $Cu(1)$ и повышает цитотоксичность. Для более подробных биологических тестов были выбраны 19 соединений-лидеров из различных типов координационных соединений. Изучено их внутриклеточное проникновение и распределение, взаимодействие комплексов с ДНК, нуклеазная активность, интеркаляция ДНК, взаимодействие с транспортными белками крови, ингибирование теломеразы, механизм клеточной смерти, способность координационных соединений генерировать активные формы кислорода, изучена цитотоксичность в 3D модели опухоли. Биологические исследования *in vitro* подтвердили гипотезу о ключевой роли электронных характеристик лиганда, геометрии координационной сферы и степени окисления металла в определении механизма цитотоксического действия металлокомплекса. Наконец, для двух соединений-лидеров были проведены *in-vivo* исследования эффективности торможения роста опухолей на животных. Была установлена максимально переносимая доза на мышах.

Экспериментальная часть составляет 54 страницы. В ней подробно описаны физико-химические и биомедицинские подходы, которые применялись в работе, а также приборы, на которых они проводились. Приведены подробные характеристики всех синтезированных соединений.

По диссертационной работе имеются следующие замечания:

1. При изучении комплексообразования меди с 3-арилзамещенных 5-((Z)-2-пиридилметил)-2-алкилтиотетрагидро-4Н-имидазол-4-онами авторами было установлено, что на степень окисления меди влияет не только восстанавливающая способность растворителя, но и электронные эффекты заместителей в лиганде. Авторы приводят качественный анализ: мезомерный эффект заместителей в бензольном фрагменте лигандов на степень окисления меди не влияет, а сильные индуктивные акцепторы эффективнее стабилизируют ионы Cu(1) в комплексе, чем индуктивные доноры; индуктивный эффект быстро затухает по цепи связей и потому наибольшее стабилизирующее действие оказывают *орто*-заместители. По мнению оппонента влияние индуктивного эффекта заместителей на степень окисления меди можно было описать количественно, используя расчет для распределения электронной плотности. При этом авторы смогли бы получить шкалу, по которой можно было бы однозначно определять данное влияние. Также имело бы смысл использовать методы QSAR для предсказания цитотоксичности лигандов и координационных соединений.

2. В фармакологии есть важное понятие селективности препарата. Насколько хорошо препарат действует, например, на зараженные клетки или бактерии, и что при этом происходит со здоровыми клетками. По мнению оппонента, в диссертационном исследовании необходим вывод о селективности действия соединений-лидеров на опухолевые клетки. И какая перспектива у соединений-лидеров стать противоопухолевыми препаратами нового поколения?

3. Опечатки и недочеты. Объем диссертационного исследования 245 страниц. Следует отметить, что работа оформлена очень аккуратно и тщательно. Несмотря на значительный объем работы, опечаток и недочетов было минимальное количество.

Стр. 37, абзац 1. Полу-сэндвичевый пишется слитно, без дефиса.

Стр. 86, абзац 2. Пропущена точка.

Стр. 87. Лаборатория БАОС. Не приведена расшифровка. Только после поиска стало понятно, что это Лаборатория биологически активных органических соединений.

Стр. 98, абзац 2, строка 9. Ошибка в слове «восстановление».

Стр. 124, схема 21. Во втором методе не используется TMS-защита гидроксильной группы, однако в схеме она указана.

Стр. 157. Таблицы 23 и 24. Непонятно, что такое Dox. Препарат?

Стр. 158, абзац 2, строка 5. Ошибка в слове «электроноакцепторных».

Стр. 168, абзац 1. *In vitro* пишется курсивом.

Стр. 169, абзац 2. *In vivo* пишется курсивом.

В списке литературы в ряде ссылок приведен только первый автор. Ссылки 8-10, 29, 30, 35, 37, 39, 41, 42, 45, 47-52, 54-60, 62, 63, 66, 68, 69, 72, 77, 89, 91, 95, 97, 98, 100, 103, 108, 111, 113-115, 121, 123, 125, 126, 132, 138, 142, 143, 147, 150, 151, 155, 157, 158, 160, 164, 170-172, 175, 177-181, 183, 185-187, 189, 190, 194, 199, 206, 207, 225, 227).

Для русскоязычных статей перед последним автором вместо «и» стоит «and» (ссылки 23, 33, 38, 73, 117).

Названия некоторых журналов приведено без сокращений. Должны быть следующие сокращения *Inorg. Chim. Acta* (ссылки 18, 32, 46, 52, 53, 75, 84, 96, 118, 119, 121-123, 127, 133, 153, 159, 172), *Bioorg. Med. Chem. Lett.* (ссылки 20, 185, 187), *Хим.-фарм. журн.* (ссылка 23), *Биоорганич. химия* (ссылка 24), *Bioorg. Med. Chem.* (ссылка 41), *Изв. АН. Сер. хим.* (ссылки 62, 73, 105, 220), *Russ. J. Bioorg. Chem.* (ссылка 141).

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. По новизне, оригинальности, масштабности поставленных задач, а также методов их решения, настоящая диссертационная работа заслуживает наивысшей оценки.

Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспортам

специальностей 02.00.03 – «Органическая химия» и 02.00.08 – «Химия элементоорганических соединений» (химические науки), а также критериям, определенным в пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова, а также оформлена согласно приложениям №5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Таким образом, соискатель Гук Дмитрий Александрович заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальностям 02.00.03 – «Органическая химия» и 02.00.08 – «Химия элементоорганических соединений».

Официальный оппонент:

Доктор химических наук,

Ведущий научный сотрудник лаборатории химии углеводов и биоцидов им. академика Н.К. Кочеткова, ФГБУ науки «Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН».

Верещагин Анатолий Николаевич

 «20» октября 2021

(подпись)

Контактные данные:

Тел.: +7 (499) 137-13-53, e-mail: vereshchagin@ioc.ac.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация: 02.00.03 – «Органическая химия»

Адрес места работы: 119991, г. Москва, Ленинский проспект, 47

Подпись Верещагина А.Н. ЗАВЕРЯЮ

Ученый секретарь ИОХ РАН им. Н.Д. Зелинского

кандидат химических наук

Коршевец И.К.