ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Гущиной Ольги Ивановны

«Синтез и свойства амидных производных хлоринового ряда»,

представленной на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – Биоорганическая химия

Диссертационная работа Гущиной О. И. посвящена синтезу фотосенсибилизаторов на основе амидных производных хлорина е₆, а так же конъюгатов с хлориновым макроциклом и борными кластерами или фуллереновым фрагментом, изучению биологической активности синтезированных соединений, а также получению липосомальных средств их доставки. Представленная на отзыв работа изложена на 130 страницах машинописного текста и состоит из введения, литературного обзора, обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов и списка цитируемой литературы из 103 источников.

Во введении приводятся убедительные обоснования актуальности исследований, предпринятых диссертантом. Автор справедливо отмечает, что в настоящее время фотодинамический эффект используется не только терапии онкологических заболеваний, но ДЛЯ И В офтальмологии, стоматологии и косметологии. Однако, несмотря на имеющиеся успехи применяющиеся в настоящее время фотосенсибилизаторы (ФС) далеко не всегда обладают оптимальными для использования в терапевтических целях свойствами, такими, как селективность накопления в опухоли, спектральные свойства, биодоступность и т.д. Поэтому исследования, проводимые с целью поиска новых соединений с улучшенными характеристиками, представляют большой интерес и одно из перспективных направлений состоит в химической модификации хлорофилла а и его ближайших производных. Отмечается так же, что улучшение результата терапии можно достигнуть не только путем изменения структуры соединений, но и за счет использования подходящих средств доставки действующего вещества к мишени. Автор убедительно показывает, что в качестве таких средств доставки в онкологии перспективны липосомы и мицеллы. Таким образом, актуальность предпринятого Гущиной О. И. исследования не вызывает сомнений. На представленных выше рассуждений, автор аргументировано формулирует цель диссертационной работы, которая заключается в синтезе фотосенсибилизаторов на основе амидных производных хлорина е₆,

получении на их основе-конъюгатов с борными кластерами и фуллереном, изучение биологической активности, а также исследование возможности создания липосомальных средств доставки синтезированных соединений. Исходя из поставленной цели, логично сформулированы задачи, которые необходимо решить для ее достижения.

Литературный обзор посвящен химическим превращениям феофорбида a и соответствует заявленной тематике работы, и его основные разделы связаны с исследованиями, проводимыми диссертантом. В обзоре представлены реакции окисления и восстановления хлоринового макроцикла, некоторые химические превращения винильной группы в пирроле А (присоединение галогенводородов и использование этой реакции в синтезе различных производных, аминометилирование винильной группы, ее окисление). Кроме того, описаны некоторые модификации заместителей в пиррольных кольцах B, C, D и экзоцикла E, а так же синтез на основе производных феофорбида а конъюгатов с борными кластерами и фуллеренхлориновых конъюгатов. Информация, использованная для составления литературного обзора, в значительной степени использована диссертантом при проведении химической модификации феофорбида а и его метилового эфира.

В обсуждении результатов представлен синтез амидных производных хлорина e_6 действием на феофорбид a и его метилового эфира алкиламинов, алифатических аминоспиртов и диаминов; моно-, ди- и трикатионных фотосенсибилизаторов на основе амидных производных хлорина е6, а так же конъюгатов, содержащих фрагмент хлорина е6 и клозо-декаборатного аниони или водорастворимого фуллерена С₆₀. Особый интерес, с моей точки зрения, представляет осуществленная автором реакция амидирования сложноэфирной группы экзоцикла диаминами, в результате которой в положние 13(2) внедряется активная группа, которая может быть использована для дальнейших превращений. Кроме того, обсуждаются фотохимические свойства и биологическая активность полученных хлориновых производных и конъюгатов и приводятся результаты по изучению способности различных производных взаимодействовать с липидами и состав липосом. Выбранное на основании результатов биологического тестирования на клетках соединение-лидер исследовано с точки зрения накопления в опухолевой ткани и показана эффективность использованной системы доставки. В целом, в обсуждении представлен большой объем работы, выполненный как лично диссертантом, так и совместно с коллегами из других организаций. В результате автором

осуществлен синтез ранее не описанных соединений, в том числе катионных хлоринов с одной, двумя и тремя заряженными группами, бор-хлориновых конъюгатов с алкильными спейсерами различной длины, конъюгата с гидрофильным фуллереновым фрагментом, продемонстрирована высокая фотохимическая активность синтезированных соединений, показана возможность использования липосом в качестве средства доставки многих соединений, показано, что наличие заряда или полярных групп в молекуле позволяет более эффективно включать хлориновые ФС в липидный бислой по сравнению с незаряженными гидрофобными структурами. Таким образом, научная новизна работы Гущиной О. И. не вызывает сомнений.

В ходе выполнения работы подобраны оптимальные условия синтеза амидных производных хлорина е6 из феофорбида а и его метилового эфира, способ предложен синтеза водорастворимого трикатионного фотосенсибилизатора на основе амидных производных хлорина e_6 , продемонстрирована высокая фотоцитотоксичность синтезированных фотосенсибилизаторов на основе амидных производных хлорина е6, на культурах опухолевых клеток и подобраны условия для получения липосомальных форм высокой эффективностью включения фотосенсибилизатора и высокой стабильностью при хранении. Полученные биологических результаты испытаний синтезированных хлориновых производных и их липосомальных форм показываю тперспективность использования подобных структур качестве высокоактивных фотосенсибилизаторов ДЛЯ применения В медицине. Полученные диссертантом результаты могут найти практическое применение при ΦС разработке медицинского назначения. Таким образом. практическая значимость результатов, полученных Гущиной О. И., не вызывает сомнений.

В экспериментальной части представлены методики синтеза и спектральные характеристики амидных производных хлорина е₆ и метилфеофорбида а, получение липосомальных форм амидных производных хлорина е₆, методики исследования фотохимических свойств и биологической активности полученных соединений.

К представленной на отзыв работе имеется ряд вопросов и замечаний.

1. Синтез моно-, ди- и триамино-производных хлорина е₆ (соответственно, 4a, 8 и 9) из метилфеофорбида *а* описан и применяется для получения различных хлоринов довольно давно (см. процитированные в

диссертации ссылки 3, 4 и 40; более свежий обзор: Рос. хим. ж. (Ж. Рос. хим. об-ва им. Д.И. Менделеева), 2017, т. LXI, № 3, стр. 69-109 и ссылки в этих работах). Однако в работе не только нет сопоставления спектральных характеристик полученных соединений с литературными данными, но и не приведены сами эти спектральные характеристики и выходы полученных соединений. Это необходимо сделать, поскольку использованная автором методика отличается от литературной и продукты необходимо надежно идентифицировать. Кроме того, имеются некоторые вопросы идентификации полученных на их основе катионных производных. Для дикатионного хлорина 10 найдено m/z: 780.6 (интерпретация «[M-2I]⁺»); для трикатионного 11 m/z: 852.1 (интерпретация «[M-3I]⁺»). Значение m/z, если ничего, кроме аниона Г не отщепляется, должны быть в 2 и 3 раза ниже, соответственно, для дикатионного и трикатионного производного. Однако, судя по приведенным в работе данным, заряд образовавшегося иона равен 1. Полученный результат требует дополнительных пояснений.

2. Имеются неясности, несоответствия и ошибки при описании амидирования сложноэфирной группы экзоцикла метилфеофорбида а диаминами. Во-первых, в процитированной работе 38 амидирование экзоцикла проводится при кипячении в диоксане, а не в толуоле. Смена направления реакции аминов с метилфеофорбидом а проанализирована в другой работе (Журнал общей химии. 2011. Т.81. №6. С.1023–1028), там же предложено проводить амидирование при добавлении амина в кипящий раствор метилфеофорбида а в толуоле. Во-вторых, обсуждении результатов автор пишет, что реакция «... реакция амидирования протекает при нагревании до 110 °C с выходом до 65-70%», и тут же указывается, что «При внесении алкилдиамина в кипящий раствор метилового эфира феофорбида а в толуоле не наблюдается образования побочных продуктов». В то же время, а в экспериментальной части написано: «Навеску метилового эфира феофорбида а массой 30 мг (49.5 мкмоль) растворяли в 5.0 мл толуола и нагревали до температуры 100°C. Затем в токе аргона добавляли алкилдиамин (этилендиамин/1,4-диаминобутан/1,6- диаминогексан/ 1,8диаминооктан, 1,10-диаминодекан) (1.73 ммоль) и перемешивали смесь в темноте при температуре 105°С в течение 4 часов». Возникает важный для воспроизведения этого процесса вопрос: при какой температуре проводилась реакция? Доводилась ли реакционная смесь до кипения? Если доводилась, то как определяли температуру проведения реакции? Температура кипения толуола 110.6 °C, однако ее нельзя считать температурой проведения реакции, поскольку раствор будет кипеть при более высокой температуре,

чем растворитель и необходимо замерять температуру непосредственно в реакционной смеси. Было ли это сделано?

- 3. В работе допущено некорректное изложение спектральных данных. Так, в спектрах ЯМР ¹Н константы спин-спинового взаимодействия указаны с точностью и до десятых и до сотых (необходимо пояснить, что является правильным для использованного прибора), в некоторых случаях для мультиплетов указан не центр, а диапазон химических сдвигов, что неверно. Приведенные на рисунках 6 и 12 спектры не соответствуют данным, приведенным в экспериментальной части. Не ясно, что означает ион [М+1]? Соединений За, Зв и З д описаны в работе 41, поэтому необходимо сопоставить спектральные характеристики полученных веществ с описанными в литературе.
- 4. При изучении различных свойств синтезированных соединений автор отмечает ряд интересных тенденций, однако не дает объяснений их причин с точки зрения структуры соединений. Так, например, при анализе влияния строения соединения на включение в липосомы отмечается влияние размера алкильного заместителя, наличия алкильной или терминальной гидроксильной группы, однако ничего не говорится о возможных причинах такого влияния. Отмечается, что наличие фрагмента фуллерена способствует повышению эффективности генерации супероксиданионрадикала, но причины влияния фуллереновых фрагментов не обсуждаются.
- 5. Имеется рад вопросов по изложению результатов биологических испытаний. Из работы не ясно, как определялись коэффициент накопения и ΠJ_{50} (для клеток обычно используют IC_{50}). Не указаны погрешности определения доли поврежденных клеток.
- 6. В работе содержится ряд неточностей в изложении литературных данных и терминологии, ошибок в структурных формулах соединений и неудачных выражений. В тексте диссертации отсутствуют формулировки цели и задач. Это несколько необычно, диссертация, в результате полностью читается только в комплекте с авторефератом, что не очень удобно.

Таким образом, Гущиной О. И. выполнено комплексное исследование в области химии природных тетрапиррольных соединений — макроциклов, синтезированных на основе феофорбида а и его метилового эфира; получена информация практически важные для применения в фотодинамической терапии свойства синтезированных соединений. В диссертационной работе Гущиной О. И. представлен значительный по объему, новизне, теоретической и практической значимости материал. Достоверность

описанных в диссертации результатов не вызывает сомнений. В целом диссертационная работа носит завершенный характер. Материал диссертации Гущиной О. И. по совокупности выполненных исследований в области модификации химической природных макроциклических соединений, изучения свойств и оценки возможного использования синтезированных соединений в фотодинамической терапии соответствует паспорту научной специальности 02.00.10 - Биоорганическая химия (пункт № 5 паспорта специальности). Результаты диссертации достаточно полно отражены в публикациях автора. Диссертационная работа Гущиной Ольги Ивановны «Синтез и свойства амидных производных хлоринового ряда» представляет собой законченное исследование, которое по актуальности, новизне экспериментального материала и достоверности сделанных выводов отвечает требованиям ВАК РФ, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата химических наук, согласно пунктам 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней» (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842, с изменениями Постановлений Правительства РФ от 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 № 748; 29.05.2017 № 650), а автор работы Гущина Ольга Ивановна – заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 - Биоорганическая химия.

Старший научный сотрудник

Института химии Коми НЦ УрО РАН,

д.х.н., доцент

Адрес: Россия, 167000, г. Сыктывкар,

ул. Первомайская, 48

Тел.: +7(8212)21-99-16

E-mail: belykh-dv@chemi.komisc.ru

Подпись

Д.В. Белых заверяю:

Ученый секретарь Института химин

Коми НЦ УрО РАН, к.х.н.

Клочкова Ирина Владимировна

Белых Дмитрий Владимирович