

«УТВЕРЖДАЮ»

Руководитель Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, доктор биологических наук, профессор АН РБ


В.Б. Мартыненко

«18» июня 2024 г.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

**Федерального государственного бюджетного научного учреждения
Уфимского федерального исследовательского центра
Российской академии наук**

Диссертационная работа «Ti-Катализируемое гомо- и кросс-цикломагнирование 1,2-диенов в синтезе природных и синтетических $nZ, (n+4)Z$ -диеновых кислот – ингибиторов топоизомераз I и II» Салимовой Альфии Раисовны (изменила фамилию Мулюкова на Салимова, основание: свидетельство о браке П-АР №801825 от 06.02.2016) выполнена в Институте нефтехимии и катализа – обособленном структурном подразделении Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук (ИНК УФИЦ РАН) в Лаборатории каталитического синтеза и Лаборатории молекулярного дизайна и биологического скрининга веществ-кандидатов для фарминдустрии.

В период подготовки диссертации соискатель Салимова А.Р. обучалась в очной аспирантуре (01.09.2014г.-31.08.2018г.) Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук. С 1 сентября 2018 г. по 1 февраля 2019 г. работала в должности младшего научного сотрудника Лаборатории каталитического синтеза ИНК УФИЦ РАН. Со 2 февраля 2019 г. по 30 ноября 2019 г. в должности младшего научного сотрудника Лаборатории

молекулярного дизайна и биологического скрининга веществ-кандидатов для фарминдустрии ИНК УФИЦ РАН. С 1 декабря 2019 г. по 31 октября 2020 г. ведущим специалистом-экспертом отдела по организации обращения с отходами Министерства природопользования и экологии Республики Башкортостан. С 1 декабря 2020 г. по настоящее время работает ведущим специалистом-экспертом информационно-аналитического отдела Минэкологии РБ.

В 2013 г. Салимова А.Р. окончила Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Уфимский государственный университет экономики и сервиса» с присуждением квалификации «инженер-эколог» по специальности «охрана окружающей среды и рациональное использование природных ресурсов».

В 2018 г. окончила очную аспирантуру при ИНК УФИЦ РАН в Лаборатории каталитического синтеза по направлению подготовки 04.06.01. – Химические науки.

Удостоверение № 1062-18 о сдаче кандидатских экзаменов по дисциплинам «История и философия науки (химические науки)» и «Иностранный язык (английский)» выдана Федеральным государственным бюджетным образовательным учреждением высшего образования «Уфимский государственный нефтяной технический университет».

Справка № 5 о сдаче кандидатского экзамена по дисциплине «Медицинская химия» выдана 21.06.2021 г. Федеральным государственным бюджетным учреждением науки Институт физиологически активных веществ Российской академии наук.

Справка № 18/652.3 о сдаче кандидатского экзамена по дисциплине «Органическая химия» выдана 27.03.2024 г. Федеральным государственным бюджетным научным учреждением Уфимский федеральный исследовательский центр Российской академии наук.

Научный руководитель – Дьяконов Владимир Анатольевич, доктор химических наук (02.00.03 – Органическая химия и 02.00.15 – Кинетика и катализ), доцент, профессор РАН, руководитель группы «Лаборатория

металлоорганического синтеза и катализа №25» Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института органической химии им. Н.Д. Зелинского Российской академии наук.

Научный консультант – Джемилева Лиля Усеиновна, доктор медицинских наук, доцент (03.02.07 - Генетика), ведущий научный сотрудник Лаборатории металлокомплексных и наноразмерных катализаторов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института органической химии им. Н.Д. Зелинского Российской академии наук.

По итогам обсуждения диссертационной работы принято следующее заключение:

Оценка выполненной соискателем работы

Диссертационная работа Салимовой А.Р. «Ti-катализируемое гомо- и кросс-цикломагнирование 1,2-диенов в синтезе природных и синтетических $nZ,(n+4)Z$ -диеновых кислот – ингибиторов топоизомераз I и II» является цельной, самостоятельной и законченной научно-исследовательской работой, выполненной на высоком профессиональном уровне и отвечает критериям «Положения о присуждении ученых степеней» ВАК Минобрнауки России (пп.9-14), утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 (в действующей редакции), предъявляемым к кандидатским диссертациям.

Актуальность работы

Поиск новых эффективных и малотоксичных противоопухолевых препаратов – одна из важнейших задач современной медицинской химии. Одним из подходов к решению данной задачи является разработка новых соединений, воздействующих на молекулярные мишени, которые играют важную роль в процессах канцерогенеза и при повреждении которых происходит гибель опухолевой клетки.

Из литературы известно, что ДНК – зависимые ферменты топоизомеразы, ответственные за топологию ДНК при ее синтезе и играющие одну из ключевых ролей в функционировании генетического аппарата клетки, рассматриваются

в качестве перспективных внутриклеточных мишеней для разработки современных противоопухолевых соединений – ингибиторов топоизомераз.

В настоящее время известно большое число соединений различных классов способных оказывать ингибирующее действие на топоизомеразы, в том числе и выделенных из природных объектов, например, камптотецин, подофиллотоксин, антрациклины и многие другие. Однако, наряду с эффективным действием, они обладают рядом существенных недостатков, основные из которых – высокая токсичность, низкая растворимость, низкая селективность действия в отношении злокачественных новообразований и развитие множественной лекарственной устойчивости (МЛУ).

Большим потенциалом среди известных ингибиторов топоизомераз человека обладают 5Z,9Z-диеновые кислоты, выделяемые из различных видов морских губок, кораллов и плодов голосеменных растений, т.к. они принадлежат к группе неспецифических блокаторов ферментов, и, как следствие, не приводят к необратимому повреждению ДНК, обладают низкой токсичностью.

Известные в литературе методы и подходы к синтезу этого класса соединений многостадийны, требуют применения дорогостоящих и труднодоступных реактивов, что существенно осложняет исследования в этой области.

В связи с вышеизложенным, разработка ценного для практического применения в лабораторной практике и последующего внедрения в методологию органического синтеза принципиально нового метода конструирования непредельных алифатических карбоновых кислот, содержащих строго 5Z,9Z-двойные связи высокой степени стереочистоты, близкой к 100 %, а также их производных, молекулы которых наряду с 5Z,9Z-двойными связями включают функциональные группы различной природы, активные синтетические и природные фармаконы с противоопухолевой и антиоксидантной активностью, а также дополнительные двойные связи с различным удалением от карбоксильной группы, является важной и актуальной задачей.

Наиболее существенные научные результаты, полученные лично соискателем

Личный вклад Салимовой А.Р. состоит в непосредственном участии в определении целей и постановке задач исследования, в поиске и анализе литературных данных, планировании и проведении экспериментальных работ, интерпретации данных, полученных в ходе экспериментов, участие в проведении тестов полученных соединений на биологическую активность, подготовке статей и тезисов докладов для апробации на конференциях. Все результаты, приведенные в диссертации, получены либо лично автором, либо при его непосредственном участии.

Автором выполнена программа ориентированных фундаментальных исследований, посвященных разработке эффективного, универсального и перспективного для применения в практике медицинской и органической химии метода синтеза стереоизомерно чистых природных и синтетических $nZ(n+4)Z$ -диеновых кислот, а также их производных, с различным расположением $1Z,5Z$ -диенового фрагмента относительно карбоксильной группы. Автором разработаны альтернативные методы синтеза ранее труднодоступных природных $nZ(n+4)Z$ -диеновых кислот.

Для синтезированных высших диеновых кислот, а также их производных, автором впервые проведены исследования по изучению их свойств в качестве ингибиторов топоизомеразы человека I и II *in vitro*. Среди синтезированных кислот найдены наиболее активные ингибиторы топоизомераз I и II, установлены закономерности влияния структуры $nZ(n+4)Z$ -диеновых кислот на проявляемую ими активность ингибирования топоизомеразы, а также изучена их цитотоксическая активность в отношении опухолевых клеточных линий.

Автором исследовано влияние природных $5Z,9Z$ -диеновых кислот на характер распределения клеток по фазам клеточного цикла в культуре раковых клеток Jurkat.

Впервые осуществлен стереоселективный синтез ранее неописанной в литературе $(5Z,9Z)$ -11-фенилундека-5,9-диеновой кислоты,

обладающей выраженной ингибирующей активностью в отношении топоизомераз I и IIa *in vitro*.

Материалы исследований опубликованы в научной печати и представлены на научных конференциях.

Достоверность полученных результатов

Высокая достоверность полученных результатов достигнута в результате применения для идентификации продуктов реакций одномерной, двумерной (^1H и ^{13}C), гомо- (COSY, NOESY) и гетероядерной (HSQC, HMBC) спектроскопии ЯМР, масс-спектропии (MALDI TOF/TOF), ИК-спектроскопии. Биологическая активность соединений изучалась с привлечением современных методов проточной цитометрии и многопараметрического иммуноферментного анализа. В работе были использованы различные раковые иммортализованные линии клеток различных видов лейкемии (Jurkat, HL-60, K562, U937), полученные из Европейской клеточной коллекции (ECCAC).

Научная новизна и практическая значимость полученных результатов

В рамках диссертационной работы Салимовой А.Р. получены следующие новые результаты:

- Разработан эффективный, универсальный и перспективный для применения в практике медицинской и органической химии метод синтеза природных и синтетических стереоизомерно чистых $nZ(n+4)Z$ -диеновых кислот, а также их производных, с различным расположением диеновой группировки относительно функциональной группы, получение которых основано на применении оригинальной реакции перекрестного каталитического межмолекулярного цикломагнирования алифатических и функциональнозамещенных терминальных алленов с помощью доступных реактивов Гриньяра под действием комплексного катализатора на основе Ti . Метод характеризуется высокой стереоселективностью (>98%) и высокими выходами целевых продуктов реакции (61-72%).

- Изучены закономерности влияния структуры синтезированных ненасыщенных стереоизомерно чистых $nZ(n+4)Z$ -диеновых кислот на проявляемую ими активность ингибирования по отношению к топоизомеразе I (hTop1) и II (hTop2 α). Обнаружено, что существенное влияние на активность ингибирования оказывает расположение 1Z,5Z-диеновой группировки относительно карбоксильной группы.

- Обнаружена высокая ингибирующая активность топоизомераз I (hTop1) и II (hTop2 α) *in vitro* для 5Z,9Z-эйкоза-5,9-диеновой кислоты. Изучена цитотоксическая активность указанного соединения в отношении опухолевых клеточных культур HL-60 и K562. Показано, что 5Z,9Z-эйкоза-5,9-диеновая кислота эффективно подавляет рост клеток линии K562 в сравнении с камптотецином и этопозидом ($IC_{50}=0.27\pm 0.015$ мкМ).

- Разработан оригинальный метод синтеза неописанной ранее в литературе (5Z,9Z)-11-фенилундека-5,9-диеновой кислоты. Показано, что (5Z,9Z)-11-фенилундека-5,9-диеновая кислота проявляет выраженную активность в ингибировании топоизомераз I и II *in vitro*.

- Выявлен положительный эффект введения электронодонорного фенильного радикала в структуру 5Z,9Z-диеновых кислот, заключающийся в увеличении степени ингибирования топоизомеразы I и II. Исследованиями *in silico* показано, что замена алкильной цепочки в молекуле 5Z,9Z-диеновой кислоты на фенильный радикал приводит к тому, что процесс ингибирования может носить двойственный характер, т.е. происходить по специфическому и неспецифическому механизму ингибирования.

- Определена дозозависимая противоопухолевая активность 5Z,9Z-эйкоза-5,9-диеновой и (5Z,9Z)-11-фенилундека-5,9-диеновой кислот – наиболее перспективных производных природных 5Z,9Z-диеновых кислот, проявивших высокую активность ингибирования топоизомераз I/II, в экспериментах *in vivo* на мышах с перевитой злокачественной карциномой легких Льюис (LLC) и солидной злокачественной мышинной лимфомой (RLS). Выявлено достоверное увеличение продолжительности жизни мышей с LLC под влиянием (5Z,9Z)-эйкоза-5,9-диеновой кислоты.

- Впервые получены синтетические аналоги природных 5Z,9Z-диеновых кислот, содержащие в своей структуре алифатический и ароматический фрагменты, путем осуществления реакции этерификации (5Z,9Z)-тетрадека-5,9-диен-1,14-дикарбоновой кислоты с алифатическими и ароматическими спиртами и алифатических и ароматических карбоновых кислот с (5Z,9Z)-1,14-ундека-5,9-диендиолом.

- Установлено, что синтезированные сложные эфиры ненасыщенных 5Z,9Z-диеновых кислот проявляют высокий цитотоксический эффект в отношении ряда раковых и нормальных клеточных линий (Jurkat, HL-60, K562, U937, Fibroblasts), индуцируя гибель клеток через апоптоз, вызывая арест клеточного цикла в фазе G1/S. Также показано, что синтезированные соединения проявляют ингибирующую активность по отношению к человеческой топоизомеразе I.

- Установлено, что цитотоксическая активность сложных эфиров ненасыщенных 5Z,9Z-диеновых кислот заметно снижается при замене ароматических радикалов на алифатические, а также при увеличении длины алифатического радикала. Уменьшение активности, вероятно, обусловлено дополнительными эффектами благодаря р-р-взаимодействию ароматического радикала с молекулярной мишенью (топоизомеразой), обнаруженными нами ранее для (5Z,9Z)-11-фенилундека-5,9-диеновой кислоты. Также показано, что с увеличением количества метиленовых звеньев в алифатических спиртах, возникают препятствия для включения исследуемых эфиров в полость фермента вследствие стерических факторов.

- Исследовано влияние 5Z,9Z-диеновых кислот на характер распределения клеток по фазам клеточного цикла, а также изучены процессы индукции процесса апоптоза в культуре раковых клеток Jurkat.

- Установлено, что 5Z,9Z-диеновые кислоты значительно меняют белковый профиль основных 9 киназ опухолевых клеток Jurkat, подавляя сигнальные пути, ответственные за рост и пролиферацию клетки, в сторону ингибирования роста и подавления пролиферации.

Теоретическая и практическая значимость результатов

Выполнена широкая программа ориентированных фундаментальных исследований по созданию и разработке важных и перспективных для практического применения методов синтеза природных стереоизомерно чистых $nZ(n+4)Z$ -диеновых кислот, а также их синтетических производных различной химической структуры. Одновременно проведено подробное изучение их свойств *in vitro* в качестве ингибиторов топоизомеразы человека I и II, установлена зависимость эффективности ингибирования топоизомераз от структуры кислот и природы заместителя. С помощью молекулярного докинга *in silico* предложен механизм ингибирования фермента, проведены эксперименты *in vivo* по изучению противоопухолевых свойств 5Z,9Z-диеновых кислот на лабораторных животных с перевитой злокачественной карциномой легких Льюис (LLC) и солидной злокачественной мышинной лимфомой (RLS).

Выполненные исследования и полученные результаты открывают новые перспективы для создания на основе 5Z,9Z-диеновых кислот современных, малотоксичных противоопухолевых препаратов таргетного действия для лечения онкологических заболеваний.

Полнота изложения материалов диссертации в опубликованных работах

По материалам диссертационной работы опубликовано 13 научных трудов, из них 7 статей в международных журналах, рекомендованных ВАК и индексируемых в системах Scopus и Web of Science, а также тезисы 6 докладов на российских и международных научно-практических конференциях.

Список статей:

1. D'yakonov, V.A. Stereoselective synthesis of 11-Phenylundeca-5Z,9Z-dienoic acid and investigation of its human topoisomerase I and II α inhibitory activity / V.A. D'yakonov, L.U. Dzhemileva, A.A. Makarov, A.R. Mulyukova, D.S. Baev, E.K. Khusnutdinova, T.G. Tolstikova, U.M. Dzhemilev // Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters. – 2015. – V.25(11). – P. 2405–2408.

2. D'yakonov, V.A. 11-Phenylundeca-5Z,9Z-dienoic acid: stereoselective synthesis and dual topoisomerase I/II α inhibition / V.A. D'yakonov, L.U. Dzhemileva, A.A. Makarov, **A.R. Mulyukova**, D.S. Baev, E.K. Khusnutdinova, T.G. Tolstikova, U.M. Dzhemilev // *Current Cancer Drug Targets*. – 2015. – V.15(6). – P. 504-510.

3. D'yakonov, V.A. Catalytic cyclometallation in steroid chemistry III: Synthesis of steroidal derivatives of 5Z,9Z-dienoic acid and their human topoisomerase I inhibitory activity / V.A. D'yakonov, L.U. Dzhemileva, R.A. Tuktarova, A.A. Makarov, I.I. Islamov, **A.R. Mulyukova**, U.M. Dzhemilev // *Steroids*. – 2015. – V.102. – P. 110-117.

4. Дьяконов, В.А. Синтез и превращения металлациклов. Сообщение 46. Перекрестное цикломагнирование 1,2-диенов в синтезе 5Z,9Z-диеновых кислот - эффективных ингибиторов топоизомеразы I / В.А. Дьяконов, Л.У. Джемилева, А.А. Макаров, **А.Р. Мулюкова**, Р.А. Туктарова, И.И. Исламов, У.М. Джемилев // *Известия АН, Серия химическая*. – 2015. – №9. – 2135-2140.

5. D'yakonov, V.A. nZ,(n+4)Z-dienoic fatty acids: a new method for the synthesis and inhibitory action on topoisomerase I and II α / V.A. D'yakonov, L.U. Dzhemileva, A.A. Makarov, **A.R. Mulyukova**, D.S. Baev, E.K. Khusnutdinova, T.G. Tolstikova, U.M. Dzhemilev // *Medicinal Chemistry Research*. – 2016. – V.25(1). – P. 30-39.

6. D'yakonov, V.A. A new stereoselective synthesis of biologically active di- and trienoic acids containing a 1Z,5Z-diene moiety / V.A. D'yakonov, A.A. Makarov, **A.R. Salimova**, E.N. Andreev, U.M. Dzhemilev // *Mendeleev Communications*. – 2017. – V.27. – P. 234-236.

7. Makarov, A.A. New Synthetic Analogs of Natural 5Z,9Z-Dienoic Acids: Stereoselective Synthesis and Study of the Anticancer Activity / A.A. Makarov, L.U. Dzhemileva, **A.R. Salimova**, E.Kh. Makarova, I.R. Ramazanov, V.A. D'yakonov, U.M. Dzhemilev // *Bioorganic Chemistry*. – 2020. – V.104. – P.104303.

8. D'yakonov, V.A. Natural and Synthesis nZ,(n+4)Z-Dienoic Fatty Acids: A New Method for the Synthesis and Inhibitory Action on Topoisomerase I and II α /

V.A. D'yakonov, L.U. Dzhemileva, A.A. Makarov, **A.R. Mulyukova**, U.M. Dzhemilev // MedChem. – Novosibirsk, 2015. P.170.

9. D'yakonov, V.A. Stereoselective Synthesis of 11-Phenylundeca-5Z,9Z-dienoic Acid and Investigation of Its Human Topoisomerase I and II α Inhibitory Activity // V.A. D'yakonov, L.U. Dzhemileva, A.A. Makarov, **A.R. Mulyukova**, U.M. Dzhemilev // MedChem. – Novosibirsk, 2015. – P.171.

10. Дьяконов, В.А. Высшие nZ,(n+4)Z-диеновые кислоты: новый метод синтеза и ингибирующая активность по отношению к человеческим топоизомеразам I и II α / В.А. Дьяконов, Л.У. Джемилева, А.А. Макаров, **А.Р. Мулюкова**, У.М. Джемилев // Второй Международный Симпозиум по Медицинской, Органической и Биологической Химии. – Крым, 2015 – 2015. – С.85.

11. Дьяконов, В.А. Новое поколение малотоксичных таргетных противоопухолевых препаратов на основе природных и синтетических 5Z,9Z-диеновых кислот / В.А. Дьяконов, А.А. Макаров, Р.А. Туктарова, Л.У. Джемилева, М.М. Юнусбаева, **А.Р. Салимова**, С.Р. Ишмухаметова, У.М. Джемилев // Научная конференция грантодержателей РНФ «Фундаментальные химические исследования XXI-го века». – Москва, 2016. – С.132.

12. Дьяконов, В.А. 5Z,9Z-Диеновые кислоты: стереоселективный синтез и противоопухолевая активность / В.А. Дьяконов, Л.У. Джемилева, А.А. Макаров, **А.Р. Салимова**, Р.А. Туктарова, У.М. Джемилев // XX Менделеевский съезд по общей и прикладной химии. – Екатеринбург, 2016 – С.593.

13. Дьяконов, В.А. Природные и синтетические 5Z,9Z-диеновые кислоты: стереоселективный синтез и противоопухолевая активность / В. А. Дьяконов, Л.У. Джемилева, Р.А. Туктарова, А.А. Макаров, М.М. Юнусбаева, **А.Р. Салимова**, С.Р. Ишмухаметова, У.М. Джемилев // Всероссийская научная конференция с международным участием «Современные проблемы органической химии» – Новосибирск, 2017. – С. 74.

Соответствие содержания диссертации паспорту специальности

Диссертационная работа Салимовой Альфии Раисовны соответствует паспорту научной специальности 1.4.3. Органическая химия, а именно пунктам: 1 – «Выделение и очистка новых соединений»; 3 – «Развитие рациональных путей синтеза сложных молекул» и паспорту научной специальности 1.4.16. Медицинская химия, а именно пункту: 6 – «Биологическое и физиологическое (*in vitro* и *in vivo*) тестирование сконструированных и синтезированных соединений на предмет изучения особенностей их взаимодействия с молекулярными мишенями организма.

Диссертация Салимовой А.Р. «Ti-Катализируемое гомо- и кросс-цикломагнирование 1,2-диенов в синтезе природных и синтетических $nZ, (n+4)Z$ -диеновых кислот – ингибиторов топоизомераз I и II» рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата химических наук по научным специальностям 1.4.3. Органическая химия и 1.4.16. Медицинская химия.

Заключение принято на научном семинаре Института нефтехимии и катализа – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук.

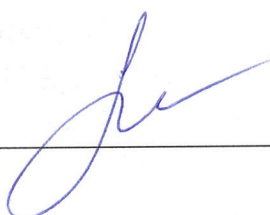
Присутствовало на заседании 59 чел. Результаты голосования: «за» – 59, «против» – нет, «воздержались» – нет, протокол № 5 от 06.06.2024 года.

Председатель семинара
Главный научный сотрудник,
заведующая лабораторией
органического синтеза Института
нефтехимии и катализа УФИЦ РАН,
д.х.н.



Парфенова Л.В.

Секретарь семинара Института
нефтехимии и катализа УФИЦ РАН,
к.ф.-м. н., с.н.с



Тухбатуллин А.А.