

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию на соискание ученой степени кандидата химических наук Краснова Владимира Сергеевича

на тему: «Синтез, структурно-функциональные свойства и тканеспецифичная инактивация митохондриальных разобщителей на основе умбеллиферона и анилинотиофена»

по специальности 1.4.9. Биоорганическая химия

Работа Краснова В.С. посвящена поиску новых разобщителей окислительного фосфорилирования, проявляющих способность менять свою активность, и поэтому пригодных для применения в медицине в качестве противовоспалительных средств, или лекарств для снижения веса. Обнаруженные в работе соединения, способные расщепляться в тканях специфическими ферментами, имеют высокий терапевтический потенциал. Поэтому актуальность данной работы не вызывает никаких сомнений.

Работа изложена на 175 страницах и состоит из обзора литературы, изложенного на 55 стр, раздела материалов и методов и результатов.

В обзоре литературы, помимо базовых представлений о функциях митохондрий и механизме окислительного фосфорилирования, автор уделяет большое внимание разобщителям окислительного фосфорилирования и, в частности, разобщителям на основе кумаринов. Кроме того, автор подробно излагает современную литературу, касающуюся метаболизма ксенобиотиков, в частности касающуюся эстераз различной специфичности. В обзоре уделено также внимание пути выведения ксенобиотиков через конъюгирование с глутатионом с его последующим АТФ-зависимым выведением из клеток с

помощью белка связанного с множественной лекарственной устойчивостью MRP.

По широте охвата литературы и глубине ее освещения обзор литературы вполне отвечает требованиям, предъявляемым к диссертациям и после некоторой стилистической доработки достоин публикации.

Методическая часть работы огромна и включает около 45 методик синтеза модифицированных кумаринов и анилинотиофенов. В работе синтезировано 31 соединение, 25 из которых синтезированы впервые. Все соединения тщательно очищены и охарактеризованы ЯМР и хроматомасс-спектрометрическими методами.

Помимо синтетической части, раздел методов включает также достаточно объемную биохимическую часть, содержащую методики оценки мембранного потенциала митохондрий и потребления кислорода. Все методики написаны настолько подробно, что могут быть воспроизведены в любой лаборатории.

Раздел результатов и обсуждения написан как детективный роман. В первой части автор показывает, что производные умбеллиферона – соединения кумаринового ряда с фенольным гидроксилом в 7 положении, содержащие карбоксильную группу в 3 или 4 положениях, способны после этерификации алифатическими спиртами проявлять действие разобщителей окислительного фосфорилирования. При этом действие всех соединений данного ряда на потенциал митохондрий сильно отличается от действия подавляющего большинства ранее известных разобщителей. При добавлении сложных эфиров умбеллиферон-карбоновой кислоты потенциал митохондрий вначале уменьшается, а затем возрастает до исходного уровня. В работе было

исследовано влияние длины и расположения гидрофобного заместителя на разобщающие свойства производных. Оказалось, что для ряда производных умбеллиферона, содержащих карбоксильные группы в 3 положении кумаринового цикла, увеличение длины гидрофобного радикала приводит к заметному замедлению снижения мембранного потенциала митохондрий, а также значительно замедляет и восстановление потенциала во времени. При этом степень снижения мембранного потенциала увеличивалась при увеличении длины радикала от 6 до 8 и 10 метиленовых групп, а затем существенно снижалась при переходе к производному с 12 метиленовыми группами.

Для объяснения явления восстановления мембранного потенциала во времени автор предположил существование каких-то процессов, возможно ферментативных, приводящих к гидролизу сложноэфирной связи в исследуемых производных умбеллиферона. Данное предположение было подтверждено экспериментально путем анализа с помощью ТСХ кумариновых производных после их инкубации в присутствии митохондрий печени крысы в течение суток. Оказалось, что после такой инкубации кумариновые производные полностью гидролизовались. Поскольку инкубация этих соединений в водном растворе в течение указанного времени не приводит к их гидролизу, можно сделать однозначный вывод о ферментативных причинах дезактивации разобщителя при его инкубации в присутствии митохондрий.

Однако автор работы не остановился на этом выводе и пошел дальше в область биохимии, пытаясь установить фермент, ответственный за гидролиз сложных эфиров умбеллиферон-карбоновой кислоты. В качестве первой рабочей гипотезы было выдвинуто предположение об участии альдегиддегидрогеназы в гидролизе сложноэфирной связи в производных умбеллиферона. Данная гипотеза подтверждалась ингибиторным анализом, т.е. ингибиторы альдегиддегидрогеназы дисульфирам и дайдзин подавляли восстановление мембранного потенциала митохондрий, подавленного производными

умбеллиферона. Однако этому предположению противоречили данные докинга и, наиболее существенно, данные, полученные прямым взаимодействием производных кумарина с препаратом фермента, выделенным из митохондрий печени крысы с помощью аффинной хроматографии на колонке с иммобилизованной 4-гидрокси- α -цианокоричной кислотой. Оказалось, что производные кумарина не расщеплялись данным ферментом, выделенным в чистом виде.

Дальнейшие исследования причин расщепления разобщителей кумаринового ряда привели автора к предположению о ключевой роли класса ферментов, называемых карбоксилэстеразами, которые присутствуют в митохондриях различных тканей. Данные ферменты в активном центре содержат триаду Glu-His-Ser, схожую с активным центром сериновых протеаз. Роль этих ферментов в митохондриях состоит в гидролизе ксенобиотиков, поступающих в печень с пищей.

Предположение о ключевой роли карбоксилэстераз было подтверждено сопоставлением данных по измерению гидролитической активности фракций элюата с колонки ГПХ и данных масс-спектрометрического анализа этих фракций. Оказалось, что пик гидролитической активности совпадал с временем элюции карбоксилэстеразы 1f. Таким образом, именно этот фермент является наиболее вероятным кандидатом на роль фермента, инактивирующего эфиры умбеллиферон-карбоновой кислоты.

Общность явления ферментативной инактивации разобщителей в митохондриях была продемонстрирована на флуазинаме и производных анилинотиофенов. Данные соединения также характеризовались временным влиянием на мембранный потенциал, которое снижалось во времени, и мембранный потенциал возрастал до исходных значений. Исследование механизма инактивации флуазинама показало, что его дезактивация в качестве разобщителя вызвана принципиально иным механизмом – присоединением к

нему остатка глутатиона. Сходный механизм дезактивации проявляется для разобшителей окислительного фосфорилирования ряда тиофенанилинов. Их сходство с флуазинамом состоит в возможности легкой модификации данных соединений тиольными группами глутатиона. Получающийся конъюгат перестает проникать через внутреннюю митохондриальную мембрану за счет приобретения трех заряженных групп и может также служить субстратом MRP, который способен выбрасывать из клеток глутатионилированные ксенобиотики. Таким образом, в работе продемонстрирован целый ряд биохимических механизмов, приводящих к сходным явлениям – снижению действия разобшителей, развивающемуся со скоростью, сопоставимой со скоростью самого снижения мембранного потенциала.

На мой взгляд, по своей оригинальности, достоверности и объему данная работа без сомнения заслуживает самой высокой оценки. Однако в процессе ее прочтения возникают некоторые вопросы.

1) Автору удалось обнаружить важный экспериментальный факт: введение гидрофобных заместителей в умбеллиферон сильно отражается на его разобщающей способности. Это кажется вполне естественным, учитывая традиционные представления о разобщающем механизме слабых кислот. Однако разобщающее действие сильно зависит от положения заместителей. Почему активность замещенных производных уменьшается в ряду заместителей в 3-ем положении кумаринового кольца > в 4-м положении >> в 6-м положении.

2) В работе обнаружен и вполне убедительно объясняется новый эффект «временного» разобщающего действия, которое может быстро отмениться вследствие действия клеточных ферментов. Создается впечатление, что метаболическая деградация разобшителя – это несомненное преимущество. Но

не приведет ли это к тому, что для создания терапевтических концентраций пациенту придется вводить высокие дозы разобщителя, что может либо нивелировать преимущества расщепляемого разобщителя, либо вызвать отравление продуктами расщепления?

3) В экспериментальной части в некоторых методиках пропущены важные стадии. Например, при получении сложных эфиров с помощью дициклогексилкарбодиимида в хлористом метиле требуется стадия отделения осадка дициклогексилмочевины, которая в работе не упоминается.

Тем не менее, отмеченные недостатки носят скорее характер рекомендаций и не умаляют значимость диссертационного исследования Краснова Владимира Сергеевича. Диссертация В.С. Краснова является законченной работой, в которой на основании выполненных автором исследований решена важная научная проблема выявления критериев выбора разобщителей окислительного фосфорилирования и установлены биохимические механизмы их тканеспецифической деградации, открывающей перспективы их использования в биомедицинской практике.

Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 1.4.9. Биоорганическая химия (по химическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова. Диссертационное исследование оформлено согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на

соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Таким образом, соискатель Краснов Владимир Сергеевич заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.9. Биоорганическая химия.

Официальный оппонент:

доктор химических наук, ведущий научный сотрудник кафедры высокомолекулярных соединений химического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Мелик-Нубаров Николай Сергеевич _____

19.01.2026

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация: 02.00.06. Высокомолекулярные соединения

Адрес места работы:

119991, г. Москва, ул. Ленинские горы, дом 1, стр. 3

МГУ имени М.В. Ломоносова, химический факультет, кафедра высокомолекулярных соединений

тел.: +7 (495) 939-31-27, e-mail: melik.nubarov@genebee.msu.ru

Подпись сотрудника химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, Н.С. Мелик-Нубарова удостоверяю:

Дата 19.01.2026 _____