

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

Актуальность темы. Диссертационная работа Краснова В.С. посвящена крайне актуальному и важному направлению современной биоорганической химии и митохондриальной биоэнергетики, а именно, разработке новых, более безопасных митохондриальных разобщителей окислительного фосфорилирования. Классические разобщители, такие как 2,4-динитрофенол (ДНФ), несмотря на высокую эффективность, обладают существенным недостатком – системной токсичностью, что ограничивает их терапевтическое применение. В связи с этим поиск и создание так называемых «мягких» разобщителей, чья активность может регулироваться *in vivo*, является одной из приоритетных задач. Предложенный автором подход, основанный на создании соединений, подвергающихся направленной тканеспецифичной ферментативной инактивации, представляется чрезвычайно перспективным для решения проблемы селективности действия. Исследование имеет фундаментальное значение для понимания механизмов взаимодействия низкомолекулярных протонофоров с биологическими мишенями и может внести существенный вклад в разработку новых подходов к лечению широкого спектра заболеваний, ассоциированных с митохондриальной дисфункцией.

Общая характеристика, структура и оформление диссертации.

Диссертационная работа Краснова В.С. выполнена в традиционной для исследований в области биоорганической химии структуре. Работа состоит

из следующих разделов: список сокращений, введение, обзор литературы (глава 1), глава, содержащая детальное описание материалов и методов исследования (глава 2), глава с изложением и комплексным обсуждением полученных результатов (глава 3), заключение, выводы, список цитируемой литературы (156 источников) и приложения. Иллюстративный материал представлен 2 таблицами и 71 рисунком, что обеспечивает наглядное подтверждение и глубокое раскрытие экспериментальных данных.

Во «Введении» автором убедительно обоснована актуальность исследования, сформулированы его цель, задачи, научная новизна, теоретическая и практическая значимость. Здесь же автор приводит основные положения, выносимые на защиту.

«Обзор литературы» выстроен по принципу от общего к частному и последовательно раскрывает теоретическую основу исследования. Обзор начинается с подробного рассмотрения строения и биоэнергетических функций митохондрий, здесь детально изложены ключевые положения хемиосмотической теории П. Митчелла и механизмы синтеза АТФ в процессе окислительного фосфорилирования, включая работу дыхательной цепи и АТФ-синтазы. Центральное место в обзоре занимает всесторонний анализ митохондриальных разобщителей. Автор систематизирует сведения о природных разобщителях, таких как термогенин и классических синтетических протонофорах (2,4-динитрофенол, СССР, СССР), рассматривая историю их открытия, структурные особенности, механизм действия и эволюцию представлений об их роли. Особое внимание уделено терапевтическому потенциалу разобщителей, а также ключевой проблеме их применения, связанной с системной токсичностью и узким терапевтическим окном. Это логично подводит к обоснованию цели работы, а именно, поиску новых, более безопасных и тканеспецифичных разобщителей. Следующий крупный раздел главы посвящен кумаринам, в частности умбеллиферону (7-гидроксикумарину). Автором приведен исчерпывающий анализ физико-химических свойств, распространения в природе и широкого спектра

биологической активности этих соединений. Акцент сделан на модульности кумаринового каркаса, что позволяет направленным химическим модификациям создавать соединения с заданными свойствами. С помощью данного раздела автор теоретически обосновывает выбор умбеллиферона в качестве платформы для дизайна новых разобщителей в рамках диссертационного исследования.

Для понимания механизмов инактивации исследуемых соединений в обзоре детально проанализированы ферментативные системы, ответственные за метаболизм ксенобиотиков. Рассмотрены структура, механизм действия, тканеспецифичная локализация и субстратная специфичность альдегиддегидрогеназ, карбоксилэстераз и глутатион-S-трансфераз. Отдельные подразделы посвящены ингибиторам ALDH2 и карбоксилэстеразы 1. Кроме того, освещены общие принципы химической модификации ксенобиотиков и фундаментальная роль глутатиона в клеточной детоксикации. Эта часть обзора предоставляет необходимый инструментарий для интерпретации экспериментальных данных по тканеспецифичному исчезновению биологической активности.

Завершающая часть литературного обзора включает разделы, посвященные конкретным классам соединений, которые также изучались в работе: флуазинаму и производным анилинотиофена. Их рассмотрение включает данные о механизме действия, метаболизме и ранее описанных случаях временной, самокупирующейся разобщающей активности соединений.

Глава «Материалы и методы» выполнена на высоком методическом уровне и демонстрирует междисциплинарный характер работы. Детально и корректно описаны современные методы органического синтеза, использованные для получения новых соединений, включая сложные эфиры умбеллиферон-3-карбоновой и -4-уксусной кислот, их структурные аналоги и производные анилинотиофена. Приведены методы очистки и идентификации синтезированных соединений (ТСХ, ЯМР, ВЭЖХ-МС). Комплекс

биофизических методов (регистрация мембранного потенциала митохондрий при помощи сафранина O, полярографическое измерение потребления кислорода, набухание митохондрий, исследования на искусственных бислойных липидных мембранах) позволяет всесторонне охарактеризовать протонотворную активность. Для изучения механизмов инактивации применен широкий спектр биохимических и аналитических подходов, включая методы ТСХ, капиллярного электрофореза, ВЭЖХ-МС, аффинная хроматография, гель-фильтрация, электрофорез в полиакриламидном геле, протеомный анализ и молекулярный докинг. Стандартизированная методика выделения митохондрий печени, сердца и почек крыс линии Wistar обеспечивает воспроизводимость и достоверность биологических экспериментов.

Глава «Результаты и обсуждение» логически структурирована и содержит полное изложение оригинальных результатов. Автор последовательно представляет данные по синтезу новых соединений, детально исследует их разобщающую активность и открытый феномен ее спонтанного тканеспецифичного исчезновения. Центральное место занимает скрупулезное изучение механизмов инактивации соединений. В этом случае автор опровергает первоначальную гипотезу об участии ALDH2 и приводит доказательство ключевой роли карбоксилэстеразы 1 (CES1) в гидролизе эфиров умбеллиферона в митохондриях печени. Важным самостоятельным результатом является обнаружение нового класса ингибиторов CES на основе производных умбеллиферон-4-глиоксалево́й кислоты. Отдельный раздел посвящен установлению альтернативного, глутатион-S-трансферазного механизма инактивации для флуазинама и анилинотиофенов. В главе проводится глубокий анализ взаимосвязи «структура-свойство», исследуется влияние длины и разветвленности алкильной цепи, положения заместителя и модификации ключевых функциональных групп на активность и метаболическую стабильность соединений. Все выводы убедительно аргументированы экспериментальными данными.

«Заключение» и «Выводы» адекватно отражают содержание диссертации, лаконично суммируя основные научные результаты.

Список литературы включает современные источники, около трети из них – это статьи не старше 5 лет. Работа оформлена в соответствии с предъявляемыми требованиями, текст отличается ясностью и логичностью изложения.

Степень достоверности результатов исследований, положений и заключения.

Достоверность научных результатов, положений и выводов, представленных в диссертационной работе Краснова В.С., обеспечивается глубокой теоретической проработкой темы, логически выверенным дизайном экспериментального исследования и применением широкого спектра современных взаимодополняющих методов, адекватных поставленным задачам.

Автором применен комплексный междисциплинарный подход, сочетающий методы органического синтеза, биофизики, биохимии и молекулярного моделирования. Все синтезированные соединения охарактеризованы современными физико-химическими методами (ЯМР, ВЭЖХ-МС), гарантирующими корректность установления их структуры и чистоты. Биофизические исследования протонофорной активности проведены на взаимодополняющих модельных системах, представленных искусственными бислойными липидными мембранами (БЛМ) и изолированными митохондриями печени, сердца и почек крыс. Использование стандартизованных, подробно описанных в главе 2 методик выделения митохондрий и измерения ключевых параметров (мембранного потенциала с сафранином O, скорости дыхания, набухания) обеспечивает высокую воспроизводимость и сопоставимость результатов.

Достоверность ключевых выводов, касающихся механизмов тканеспецифичной инактивации разобщителей, подтверждается

доказательствами, полученными с помощью независимых методик. Так, ферментативный гидролиз эфиров умбеллиферона доказан параллельно методами ТСХ и ВЭЖХ-МС. Идентификация ответственного фермента (карбоксилэстеразы 1) осуществлена на основе взаимосогласованных результатов ингибиторного анализа, аффинной хроматографии, гель-фильтрации, протеомного профилирования и молекулярного докинга. Глутатион-S-трансферазный механизм инактивации флуазинома и анилинотиофенов подтвержден сочетанием биофизических экспериментов, анализа конъюгатов методами ТСХ, ВЭЖХ-МС и капиллярного электрофореза, а также использованием специфических ингибиторов и субстратов.

Репрезентативность экспериментального материала и обоснованность выводов подтверждаются четкой воспроизводимостью кинетических кривых на представленных графиках. В случае установления ключевых зависимостей (например, «структура-активность») следует отметить систематическое изучение серий гомологичных соединений и применение взаимодополняющих методик.

Сформулированные автором выводы работы критически осмыслены, логически вытекают из представленного массива экспериментальных данных. Теоретические положения, вынесенные на защиту, находятся в конструктивном соотношении с современными научными представлениями, что отражено в обзоре литературы и детальном обсуждении результатов.

Результаты диссертационного исследования прошли успешную апробацию и признаны научным сообществом. Основные положения работы представлены на 4 российских и международных конференциях. Достоверность и новизна результатов подтверждены 5 публикациями в высокорейтинговых международных журналах (Q1), индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus.

Научная новизна, теоретическая и практическая ценность исследования.

Диссертационное исследование Краснова В.С. вносит значимый вклад в развитие биоорганической химии и митохондриальной фармакологии. Автором впервые синтезирован и всесторонне охарактеризован новый класс высокоактивных разобщителей на основе алкильных эфиров умбеллиферон-3-карбоновой и -4-уксусной кислот, что существенно расширяет арсенал известных протонофоров и утверждает кумариновый каркас в качестве перспективной структурной основы. Важнейшим открытием автора стало обнаружение уникального феномена спонтанного исчезновения активности этих соединений в митохондриях печени, что легло в основу детального исследования механизмов тканеспецифичности. Автором не только доказана ферментативная природа гидролиза как причины инактивации, но и идентифицирован конкретный ответственный фермент (карбоксилэстераза 1). Отдельным важным достижением является открытие нового класса мощных ингибиторов карбоксилэстераз на основе производных умбеллиферон-4-глиоксалевой кислоты. Параллельное исследование известных разобщителей иной структуры, а именно, флуазинама и анилинотиофенов, впервые привело к установлению для них альтернативного, глутатион-S-трансферазного механизма инактивации, также обладающего тканевой специфичностью. Таким образом, работа впервые устанавливает и исследует универсальный принцип метаболического контроля продолжительности действия митохондриальных разобщителей, что является ее безусловной фундаментальной новизной.

Теоретическая значимость диссертации заключается в существенном расширении фундаментальных представлений на стыке нескольких научных дисциплин. Так, работа вносит вклад в химию и биофизику, углубляя понимание взаимосвязи между тонкими структурными особенностями низкомолекулярных лигандов (наличие свободной гидроксигруппы, длина и разветвленность алкильного хвоста, природа эфирной связи) и их

протонофорной активностью, липофильностью и подверженностью ферментативному гидролизу. В области биохимии и энзимологии исследование дает новые знания о специфичности взаимодействия сложных эфиров с митохондриальными формами карбоксилэстераз и глутатион-S-трансфераз, а также демонстрирует возможность тонкого управления скоростью метаболизма ксенобиотиков через стерические модификации. На мой взгляд, наиболее важным теоретическим итогом является формирование концептуальной основы для направленного дизайна «мягких» митохондриально-направленных соединений, активность которых может быть запрограммирована на некоторое «самоограничение» за счет включения в их структуру метаболически лабильных элементов, распознаваемых ферментами конкретных тканей.

Практическая ценность исследования вытекает из его фундаментальных результатов. Работа открывает реальный путь к созданию нового поколения безопасных лекарственных средств для терапии широкого спектра заболеваний, ассоциированных с нарушением энергетического метаболизма и митохондриальной дисфункцией. Это и метаболический синдром, ожирение, неалкогольная жировая болезнь печени, нейродегенеративные и онкологические заболевания. Предложенный в работе подход позволяет преодолеть главное препятствие на пути клинического применения разобщителей, связанное с узким диапазоном терапевтической концентрации. Полученный патент на изобретение подтверждает техническую реализуемость разработок. Кроме прямого фармакологического применения, синтезированные соединения представляют собой ценный инструментарий для фундаментальных исследований в биоэнергетике, биохимии и токсикологии.

Соответствие содержания диссертации и автореферата. Содержание автореферата полностью отражает основное содержание диссертационной

работы. В автореферате четко сформулированы цель, задачи, основные положения, выносимые на защиту, и выводы работы.

Вопросы к работе и критические замечания.

Несмотря на безусловно высокий уровень выполненной работы, можно высказать несколько вопросов и замечаний.

Вопросы:

1. Протеомный анализ, выявивший наличие различных изоформ CES в матриксе митохондрий печени, представлен в работе несколько фрагментарно. Не до конца ясно, какая именно изоформа (или их комбинация) является основной, ответственной за гидролиз изученных эфиров умбеллиферона. Требуют ли разные производные для своего гидролиза разных изоформ CES?
2. Ваша работа *in vitro* доказывает, что гидролиз в печени опосредован CES. Однако *in vivo* ксенобиотики подвергаются действию целого ряда эстераз (в плазме крови, в эндоплазматическом ретикулуме гепатоцитов и др.). Насколько, по вашей гипотезе, выявленный вами митохондриальный путь инактивации будет конкурировать с этими другими путями метаболизма *in vivo*? Может ли это привести к ситуации, когда *in vivo* тканеспецифичность окажется менее выраженной, чем в экспериментах на изолированных митохондриях?
3. В работе показаны два принципиально разных механизма тканеспецифичной инактивации. Это гидролитический в случае кумаринов и путем конъюгации в случае флуазинама/тиофенов. С точки зрения дизайна будущих лекарств, какой из этих механизмов представляется Вам более предсказуемым и управляемым? Каковы потенциальные преимущества и риски каждого подхода?

Замечания:

1. Следует обратить внимание на оформление литературного обзора на страницах 16-25 диссертации. Для повышения академической строгости работы было бы целесообразно более полно снабдить этот раздел библиографическими ссылками. Это касается как текстовой части, излагающей общебиохимические положения, так и иллюстративных материалов.
2. В разделе, посвященном материалам и методам (стр. 12 диссертации), указано, что для изучения протонной активности использовались, в том числе, исследования на липосомах («выравнивание градиента pH на липосомах»). Однако в изложении результатов собственного исследования данные экспериментов с липосомами отсутствуют.
3. Работа демонстрирует высокую качественную воспроизводимость экспериментов, что очевидно по четкости и согласованности представленных графиков и хроматограмм. Однако в тексте отсутствует явное описание того, как обеспечивалась и оценивалась эта воспроизводимость на количественном уровне. Нет указаний на количество независимых повторностей экспериментов (n), не применяются формальные методы статистического анализа (например, оценка значимости различий).

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. 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 биологических наук, доцент, профессор кафедры биохимии, клеточной биологии и микробиологии, Институт естественных наук и фармации ФГБОУ ВО «Марийский государственный университет»

Дубинин Михаил Васильевич

21.01.2026.

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация:

1.5.22. Клеточная биология

Адрес места работы:

424000, Республика Марий Эл, г. Йошкар-Ола, пл. Ленина, д. 1, Марийский государственный университет, Институт естественных наук и фармации

Тел.: +7(987)7010437; e-mail: dubinin_mv@marsu.ru