

ОТЗЫВ

официального оппонента
Глушкова Владимира Александровича

на диссертацию КИСЕЛЕВА МАКСИМА АЛЕКСАНДРОВИЧА «Синтез, свойства и биологическая активность соединений, полученных на основе химических превращений 4-ацил-2-(2-бензоилгидразинилиден)-4-оксобутановых кислот», представленную на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия.

4-Арил-2,4-диоксобутановые кислоты и 5,5-диметил-2,4-диоксогексановая кислота являются излюбленными объектами исследования ученых Пермской государственной фармацевтической академии. Ацилгидразоны этих кислот по атому С(2) в свое время изучались в ПГФА д.ф.н. Н.А. Пулиной и д.х.н. В.О. Козьминых; в ПГНИУ этими же соединениями занимался к.х.н. А.Е. Рубцов, однако синтетический потенциал 2-ацилгидразонов ароилпировиноградной (или пивалоилпировиноградной) кислот (АПК) раскрыт еще не в полной мере. Данная работа восполняет этот пробел. Объекты исследования Киселева Максима Александровича – это бензоилгидразоны АПК, их амиды, 5-арил(т-бутил)-1-бензоил-5-(2-бензоилгидразинил)-4,5-дигидро-1*H*-пиразол-3-карбоновые кислоты, а также N'-(5-арил/трет-бутил-2-оксофуран-3(2*H*)-илиден)бензогидразиды и продукты их рециклизации с этилцианоацетатом, цианоацетамидом и динитрилом малоновой кислоты, представляющие собой 2-амино-1-бензамидо-4-оксо-5-(2-арил-2-оксоэтилиден)-4,5-дигидро-1*H*-пиррол-3-карбоновые кислоты. Исследования в области циклизации и рециклизации ацилгидразонов АПК простыми синтетическими путями приводят к разнообразно замещенным фуранонам, пирролонам, пиразолам, обладающим биологической активностью и, в частности, цитотоксическим действием. Поэтому тема работы М.А. Киселева, несомненно, **актуальна.**

Научная новизна. В результате циклизации 4-арил-2-(2-бензоилгидразинилиден)-4-оксобутановых кислот под действием ангидридов кислот М.А.Киселевым впервые получены 3-ароилгидразоны фуран-2,3-дионов, и изучены их реакции со спиртами, алифатическими и ароматическими аминами. Взаимодействием 3-ароилгидразонов фуран-2,3-дионов с этил цианоацетатом или динитрилом малоновой кислоты впервые осуществлена рециклизация их в эфиры (или нитрилы) 2-амино-1-бензамидо-4-оксо-5-(2-оксо-2-арил/трет-бутилэтилиден)-4,5-дигидро-1*H*-пиррол-3-карбоновых кислот.

Теоретическая и практическая значимость работы заключается в углублении и расширении наших знаний о химических свойствах ароилгидразонов АПК и 3-ароилгидразонах 5-арил-2,3-дигидро-фуран-2-онов. Изучена таутомерия 4-арил-2-(2-бензоилгидразинилиден)-4-карбоновых кислот, при этом показано, что преобладание той или иной таутомерной формы зависит от электронных эффектов заместителей в ароматическом ядре заместителя у атома С(4).

Синтезировано более 100 новых соединений. Проведены испытания веществ на противомикробную, противогрибковую, противовоспалительную, анальгетическую активность, а также на антиоксидантную, радикалсвязывающую и цитотоксическую активность. Перспективные соединения **9e** и **9m**, проявляющие высокую цитотоксическую активность, защищены патентом РФ и предложены для дальнейшего углубленного изучения.

Диссертация Киселева Максима Александровича общим объемом 149 страниц построена традиционно и состоит из введения, пяти глав, заключения с выводами, списка литературы и приложения; содержит 31 схему, 28 таблиц и 20 рисунков. Список литературы включает 209 работ, из которых 112 – из зарубежных источников.

Во введении (стр. 5-10) обосновывается актуальность темы исследования, ставятся цели и задачи, даются общие сведения о работе.

В главе 1 (стр. 11-41, литературный обзор общим объемом 30 страниц) приводятся данные о методах синтеза гидразидов и гидразонов ароилпировиноградных кислот и о биологической активности гидразидов вообще.

В главе 2 дан краткий обзор материалов и методов исследования, указаны марки приборов, использованных в процессе выполнения работы.

Глава 3 (стр. 47-94) – синтетическая часть диссертации, содержит описание выполненных экспериментов, доказательства структуры новых веществ с помощью ИК, ЯМР спектроскопии, а также таблицы с выходами, температурами плавления и спектральными данными. Здесь автору пришлось столкнуться с проблемой таутомерии 4-арил-2-(2-бензоилгидразинилиден)-4-оксобутановых кислот (соединения **2а-м**). Наличие трех таутомерных форм (А, В и С) значительно усложняло интерпретацию ЯМР ^1H спектров, но Максим Александрович успешно справился с этой задачей. Для каждой формы были выделены свои характеристичные сигналы (например, у формы это дублеты диастереотопных протонов $\text{C}(4)\text{H}_2$ с большими КССВ 16-20 Гц В, имеющей асимметрический атом углерода $\text{C}(5)$). На основе тщательного анализа ЯМР ^1H спектров было установлено соотношение таутомерных форм для всех новых соединений и сделаны некоторые выводы о зависимости той или иной формы от строения веществ (4-арил/4-т-бутил) и от электронных эффектов заместителей в ариле. Далее автором были получены пиразолкарбоновые кислоты как результат взаимодействия АПК с двумя эквивалентами гидразида бензойной кислоты. Этот ряд ограничен всего пятью примерами (соединения **3а-д**).

Далее были получены ключевые, как мне кажется, для данной работы соединения – 3-бензоилгидразоны 5-арил-2,3-дигидро-фуран-2,3-дионон (по номенклатуре IUPAC именуемые N' -(5-арил/трет-бутил-2-оксофуран-3(2H)-илиден)бензогидразиды) (вещества **4а-м**). Было изучено их взаимодействие с

нуклеофилами (спиртами, алифатическими и ароматическими аминами) с образованием соответственно рядов **5а-и**, **6а-е** и **7а-х**). С гетероциклическими аминами был получен ряд соединений **8а-п**. В этом разделе опять встала проблема таутомерии, но уже имеющийся опыт позволил Максиму Александровичу правильно определить соотношение таутомеров у новых соединений по данным ЯМР ¹Н спектров.

Очень любопытна рециклизация 3-гидразонофуранонов при действии производных циануксусной кислоты, приводящая к 5-аминопирролонам **9а-г**. Значительно украсило работу осуществленное восстановление соединений с сопряженной двойной связью **9а,г,ж,е,к,м** в трикарбонильные пирролоны **10а-е** (схема 31).

В главе 4 (стр. 95-116) приводятся данные и методики биологических испытаний новых соединений на антибактериальную, противовоспалительную, анальгетическую, радикалсвязывающую, антиоксидантную и цитотоксическую активность, а также сведения об испытаниях острой токсичности.

На противомикробную и противогрибковую активность было испытано 23 вещества, но ни одно из них не превзошло препараты сравнения. Поэтому диссертант перенес свои поиски на другие виды активности.

Семь испытанных соединений показали умеренную противовоспалительную активность, не превосходящую препарат сравнения нимесулид (но превосходящую метамизол натрия).

Анальгетическая активность была проверена на 25 соединениях, умеренно активны препараты **7ж** и **8д**. Хочу отметить, что в том случае, если был бы взят другой препарат сравнения (не анальгин), результаты были бы не такими радужными.

Семь соединений были проверены на радикалсвязывающую и антиоксидантную активность. Ряд соединений проявили радикалсвязывающую активность на уровне препарата сравнения (тролокс).

Наиболее всесторонне автор исследовал цитотоксическую активность синтезированных соединений. Исследования проводились по четырем клеточным линиям: SK-L-LMS-1 (лейомиосаркома), U2 Os (остеосаркома), HeLa (рак шейки матки), GIST-T1 (мезенхимальная опухоль ЖКТ). Было обнаружено, что соединения **9к** и **9м** в концентрациях 10,20 и 40 μM превосходят препараты сравнения (доксорубин, этопозид, *цис*-платин и паклитаксел) на модели SK-L-LMS-1. Неплохие результаты показали соединения **9е,ж,к,м** в отношении опухолевых клеток линии GIST-T1 и на линии клеток HeLa. Но не могу согласиться с заявлением автора, что соединение **9е** превзошло по эффективности паклитаксел в дозе 5 μM : если сравнить данные таблицы 8, то 18.6 никак не больше 21.2. Вероятно, речь идет о соединении **9м**.

Для дальнейшего углубленного исследования рекомендованы этиловый эфир 2-амино-1-бензамидо-4-оксо-5-(2-оксо-2-(4-метоксифенил)-бутилэтилиден-4,5-дигидро-1*H*-пиррол-3-карбоновой кислоты (**9е**) и этиловый эфир 2-амино-1-бензамидо-4-оксо-5-(2-оксо-2-(4-хлорфенил)-бутилэтилиден-4,5-дигидро-1*H*-пиррол-3-карбоновой кислоты (**9м**), проявляющие высокую цитотоксическую активность.

У семи соединений проверена острая токсичность. Вещества **9г,е,ж,з,и,к,м** относятся к 5 классу токсичности (практически нетоксичны).

Глава 5 (стр. 117-120) – экспериментальная химическая часть, написана весьма кратко, методики синтеза даны в общем виде.

В заключении (стр. 120-121) содержатся выводы, которые соответствуют поставленным задачам и существу проделанной работы.

Наконец, завершают работу приложения в виде актов внедрения результатов исследования Киселева М.А. в Пермской государственной фармацевтической академии и в Пермском национальном исследовательском университете.

Достоверность полученных Киселевым М.А. данных обусловлена привлечением современных физико-химических методов исследования органических соединений (элементный анализ, ИК-спектроскопия, ЯМР ^1H и ^{13}C спектроскопия, масс-спектрометрия). Строение всех новых органических соединений подтверждено совокупностью спектральных данных и не вызывает сомнений.

Научные положения диссертации Киселева М.А. соответствуют формуле специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия. Результаты проведенного исследования соответствуют области специальности, именно пункту 1 паспорта фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Замечания по автореферату.

1. На стр. 4 и 6 соединения **2а-м** названы неправильно: не 4-ацил-2-(2-бензоилгидразинилиден)-4-оксобутановые кислоты, а 4-арил... (та же ошибка в диссертации на стр. 7, 42, 47 и 120).

2. Стр. 9, схема 5. Ошибка в формуле продукта А.

3. На стр. 10 (схема 7) приведены лишь брутто-формулы использованных гетероциклов, сами гетероциклы не расшифрованы. (Такая же недоработка в диссертации на стр. 24, схема 19, и на стр. 26, схема 21. Расшифровку гетероциклических систем мы находим, наконец, на стр. 76 диссертации (подписи к схеме 28), но тут не обошлось без ошибок. Так, в соед. **8г** остаток 4-фенилтиазола приведен брутто-формулой $\text{C}_9\text{H}_7\text{NS}$, тогда как правильно $\text{C}_9\text{H}_6\text{NS}$; у соед. **8ж** вместо $\text{C}_7\text{H}_5\text{NS}$ должно быть $\text{C}_7\text{H}_4\text{NS}$; у соед. **8и** вместо $\text{C}_3\text{H}_3\text{NS}$ должно быть $\text{C}_3\text{H}_2\text{NS}$; у соед. **8к** вместо $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{NS}$ должно быть $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{NS}$; у соед. **8л** вместо $\text{C}_6\text{H}_5\text{N}$ должно быть $\text{C}_6\text{H}_6\text{N}$). Эти же ошибки перекочевали в автореферат на стр. 10, подпись к схеме 7.

4. Стр. 15-18. В таблицах 5, 6, 7 и 8 концентрация должна быть выражена в μM , а не в $\mu\text{M}/\text{мл}$! (М – это молярная концентрация, в молях на

литр, уже содержит в себе объем). В статье, опубликованной вами в *Pharmaceutical Chemistry Journal*, концентрация указана правильно.

Замечания по диссертации.

1. На мой взгляд, помимо бензгидразида как модельного соединения все-таки следовало бы также попробовать несколько (хотя бы 3-4) других замещенных ароилгидразинов, например, гидразиды анисовой, *para*-хлорбензойной и *para*-толуиловой кислот. Это ненамного расширило бы круг исследуемых соединений, но при этом значительно бы обогатило выводы о связи структура-активность в данных конкретных рядах соединений.

2. Стр. 7, третья строчка. «Обозначенный водород» должен писаться с наклоном: $1H$ (то же на стр. 34 и 42).

3. Стр.49. У соед. **2в** с нафтильным радикалом в ЯМР спектре указан сигнал 7.60 м (12H). Лучше было бы отмечать интервал расположения сигналов от и до в м.д.

4. Стр. 51-52: у соед. **2л** не указано соотношение таутомерных форм в процентах.

5. Стр. 58. Для синглета винильного протона фуранового цикла соединений **4а-м** указан интервал 7.05-7.27 м.д. Между тем у соед. **4а** он находится при 6.53, а у соед. **4ж** – при 7.50.

6. Стр. 65, схема 26: не обозначен R^2 у соед. А-Д. VzI – это, вероятно, бензил. Он обычно обозначается Bn .

7. Стр. 68. Подпись под схемой 27: 3,4-(MeO) $_2$ C $_6$ H $_3$, а не ..H $_4$. Странно обозначен *трет*-бутильный радикал: t-but (правильно: *t*-Bu).

8. Стр. 82, схема 29: вместо соед. **3а-м**, очевидно, должно быть **4а-м**.

9. Стр. 109, 110, 112, 113 (таблицы 24-27): концентрация должна быть выражена в μ M, а не в μ M/мл.

10. Многие ссылки в списке литературы оформлены по ГОСТу, вообще большой разницей в оформлении ссылок.

11. Встречаются опечатки (на стр. 3, 8, 9, 19, 20, 22, 32 (маннитол), 35, 37, 38, 40, 45 (формазан), 47, 48, 54, 88, 89, 95, 102, 103, 104, 124, 125, 128, 130).

12. Для однозначного подтверждения структуры полизамещенных гетероциклов следовало бы хотя бы 2-3 ключевых соединения изучить методом рентгеноструктурного анализа.

Перечисленные замечания относятся, в основном, к оформлению диссертации не влияют на ее высокую оценку оппонентом.

Вопросы к диссертанту:

1. В вашей статье в ЖОрХ 2016 г. № 4, С. 540-546 приведены примеры использования ароилгидразинов с заместителями в ароматическом ядре. Почему они не включены в диссертацию?

Содержание автореферата соответствует содержанию диссертации.

Основные результаты автора полностью опубликованы (в том числе в шести статьях из списка ВАК), доложены на четырех конференциях в г. Перми. Оформлен патент на изобретение (Пат. 2607920 РФ) «Этиловые эфиры 2-амино-1-бензоиламино-4-оксо-5-(2-оксо-2-арилэтилиден)-4,5-дигидро-1*H*-пирролидин-3-карбоновых кислот, проявляющие противоопухолевую активность, и способ их получения».

Диссертационная работа Киселева Максима Александровича «Синтез свойства и биологическая активность соединений, полученных на основе химических превращений 4-ацил-2-(2-бензоилгидразинилиден)-4-оксобутановых кислот» по поставленным задачам, уровню их решения, актуальности и научной новизне удовлетворяет требованиям п. п. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, Киселев Максим

Александрович, безусловно, заслуживает присуждения ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Официальный оппонент:
старший научный сотрудник
лаборатории биологически активных соединений
«Института технической химии Уральского отделения Российской академии наук» – филиала Федерального государственного бюджетного учреждения науки Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук

614013, г. Пермь, ул. академика Королева, 3
тел. (342)-237-82-66, 8-(982)-252-08-79,
e-mail: glusha55@gmail.com

доктор химических наук (02.00.03-органическая химия),
доцент


Глушков Владимир Александрович

7 декабря 2018 г.

Подпись Глушкова В.А. заверяю:
Ученый секретарь ИТХ УрО РАН, к.т.н.


Г. В. Чернова

7 декабря 2018 г.

