

О Т З Ы В

официального оппонента на диссертационную работу

Зафарова Сорбона Зафаровича

на тему: «Синтез, свойства фуллерена C₆₀ с производными аминокислот и пептидов, а также их противогепатитная активность», представленной на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.03 – органическая химия

Настоящее исследование посвящено аминокислотным и пептидным производным фуллерена C₆₀, которые получены модификацией аминокислот, пептидов и их композитов молекулой фуллерена C₆₀. Основной смысл исследовательской работы заключается в реакции присоединения аминокислот их композитов, пептидов и некоторых органических лигандов к молекуле фуллерена C₆₀, их физико-химические и антивирусные исследования.

Как отмечается, производные фуллерена модифицированным аминокислотами и пептидами имеют большое значение в химии, биологии и медицине. По мнению некоторых ученых, в последние 30 лет данные производные фуллерена будут являться важными перспективными объектами для создания материалов и лекарств нового поколения, проявляющими антивирусные и антибактериальные свойства.

В процессе присоединения к поверхности фуллерена гидрофильными лигандами происходит изменение в молекуле фуллерена в сторону гидрофильности и появления лиофильных свойств.

Основные свойства полученных аминокислотных производных являются их растворимость в воде, которая зависит от природы аминокислотного и пептидного фрагмента. В водных растворах аминокислотные и пептидные производные фуллерена, и их композитов с фуллереном находятся преимущественно в виде ассоциатов, состав, количество и форма, которых зависит главным образом от концентрации и рН растворов, наибольшая степень ассоциации молекул аминокислотных производных фуллерена АПФ наблюдается в кислой среде (рН 2-3), однако в интервале рН 4-5 происходит резкое снижение ассоциации, а далее при рН 5 остаётся практически одинаковой (n=30). При подщелачивании среды и образование солей калия и натрия аминокислотные производные фуллерена их растворимость увеличивается, и степень ассоциации молекул снижается, который необходимо, как при проведении физико-химических исследований, так и при изучении биологической активности производные фуллерена на основе аминокислот, пептидов и их композитов.

В диссертационной работе Зафарова Сорбона Зафаровича исследованы способы модификации фуллерена композитами аминокислот, аминокислот с пептидами и свободные пептиды. Также изучены их реакционная способность, число присоединившихся молекул аминокислот и пептидных фрагментов и их композитов к молекуле C_{60} , физико-химические, хроматографические и электрофоретические показатели, а также результаты химического гидролиза полученных соединений. Для изучения биологических свойств синтезированных веществ проведены антивирусные исследования в отношении инфекции вируса гепатита С.

Цели исследования. Разработка приемлемых методов синтеза новых водорастворимых аминокислотных и пептидных производных фуллерена C_{60} . Исследование физико-химических и антивирусных свойств полученных соединений в отношении инфекции вируса гепатита С.

Положение, выносимые на защиту:

1. Возможность создания эффективных водорастворимых фуллеренов с использованием гидрофильных лигандов (аминокислот, пептидов и их композитов).

2. Синтезированы нетоксичные производные фуллерена C_{60} на основе аминокислот, пептидов и их композиты с биологически активными свойствами.

3. Синтезированы новые производные фуллера C_{60} - аминокислот, пептидов и композиции с заданными последовательностями.

4. Осуществлен синтез ди-, три- и гексапептидов классическими методами пептидного синтеза в растворе с сохранением оптической активности. Произведена модификация полученных пептидов и композиции аминокислот фуллереном C_{60} .

5. Успешно проведена проверка антивирусной активности синтезированных соединений на примере гепатита С.

6. Протективное действие производных фуллерена C_{60} в системе вирус-клетка - компонента в условиях *in Vitro* в значительной степени реализуется на этапе мембранозависимой стадии вирусной репродукции.

Научная новизна исследования. Впервые синтезированы и охарактеризованы новые водорастворимые аминокислотные и пептидные производные фуллерена C_{60} и их композиты, изучена их антивирусная активность на примере вируса гепатита С. Синтезированные соединения показали высокую антивирусную активность.

Теоретическая ценность исследования. В диссертации отражены теоретические аспекты исследования: стратегия и подбор условий приемлемых в практическом плане синтеза фуллера C_{60} аминокислот и

пептидов и их композитов, растворимость в воде, в водных растворах и диметилсульфоксиде. Исследованы структурно-функциональные особенности синтезированных соединений фуллерен C_{60} в зависимости от условия реакции (температуры, растворителя, времени прохождения реакции и т.д.), выход полученных продуктов, идентичность, кристалличность и молекулярный состав синтезированных соединений, изучены физико-химические и биологические свойства полученных соединений, которые соответствуют теоретическим предположениям диссертации.

Практическая ценность исследования. Практическая значимость работы заключается в разработке эффективных методов синтеза ранее неизвестных водорастворимых фуллереновых производных на основе аминокислот, пептидов и их композитов, позволяющие получать соединения хроматографической чистоты порядка 98-99% в препаративных количествах. Полученные соединения проявляют противовирусную активность. На основе этого работа имеет фундаментальное значение и практическую ценность.

Личный вклад соискателя является определяющим в поиске и апробации научных данных литературного содержания, в постановке задач, планировании и выполнении исследования, проведении экспериментов по теме диссертации и интерпретации полученных результатов, подготовке публикаций по результатам диссертации.

Соискатель самостоятельно выделил и очистил конечные продукты, установил строение полученных веществ с помощью физико-химических методов анализа, осуществил апробацию работы на международных и республиканских конференциях.

Публикация результатов диссертации. По теме диссертации опубликованы 5 научных статей в рецензируемых научных журналах, рекомендуемых ВАК при Президенте Республики Таджикистан и Российской Федерации, а также 7 тезисов докладов в сборниках международных и республиканских конференций.

Структура и объём диссертации. Диссертационная работа изложена на 138 страницах компьютерного набора и состоит из введения и 4 глав: литературного обзора, экспериментальной части, обсуждения научных результатов, исследование противовирусных свойств, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 118 источников. Работа иллюстрирована 30 рисунками и содержит 7 схем, 4 фигуры и 7 таблиц.

Во введении обоснована актуальность темы исследования, сформулированы цель, задачи исследования, отражены научная новизна, теоретическая и практическая ценность исследования, защищаемые положения, перечислены научные конференции, на которых прошли

апробацию материалы диссертации, указан личный вклад автора диссертации.

В первой главе представлен литературный обзор по теме диссертации, рассмотрены исторические размышления относительно открытия фуллеренов, особенности их образование, производные фуллеренов и их образование, активность молекулы фуллеренов и физика фуллеренов, получения и свойства метанофуллеренов, присоединение циклических α -галогенкарбанионов к фуллеренам, модифицированные фуллерен-аминокислот и пептиды, биохимическая активность производных фуллеренов, а также антивирусная активность фуллеренов.

Вторая глава (Экспериментальная часть) В этой главе приведены методика получения водорастворимых аминокислотных и пептидных производных фуллерена C_{60} и их композиты. При синтезе использованы α -аминокислоты фирмы «Реаналь» (Венгрия), фуллерен C_{60} (Россия, Санкт-Петербург Neotechproduction Company Ltd).

Пептиды получены по известным методам классического синтеза пептидов. Температуру плавления измеряли на приборе Sore «Boettus» VEB Analitik (Германия). Идентификация, индивидуальность синтезированных соединений и ход реакций контролировали методом ТСХ на пластинках Silufol VV-254 (Чехословакия) и D-Rieselgel-60 Merk (Германия).

Хроматограммы проявляли опрыскиванием 0,05% - ным раствором нингидрина, в ацетоне содержащем CH_3COOH или хлорированием с последующей обработкой хроматограммы смесью, состоящей из равных объемов 0,5%-ного раствора КJ и раствора бензидина в 2%-ной CH_3COOH и парами кристаллического йода. Электрофорез проводился в буфере (Д) при рН 9, 400 V, 15 μ A. ИК – спектры записывали на приборе SHIMADZU FTIR Measurement. Молекулярную массу веществ установили с помощью MALDI-TOF.

Спектр 1H и ^{13}C ЯМР получали на спектрофотометре Bruker AM-300 (соответственно 300 и 75,5 МГц в $CDCl_3$) внутренний стандарт $SiMe_4$. Данные элементного анализа синтезированных соединений соответствовали расчетным данным. Элементный анализ соединений проводили в аналитической лаборатории НИИ при ТНУ на приборе vigo MICRO CHNS.

Для идентификации аминокислот, пептидов и фуллерена C_{60} , пептиды подвергали кислотному гидролизу в 6н и 12н. HCL. Образующиеся свободные аминокислоты и фуллерена C_{60} идентифицировали с помощью ТСХ и электрофорезом.

Третьей глава (Обсуждение научных результатов). В настоящей главе обсуждена методика синтеза и характеристика фуллеро C_{60} - аминокислот и аминокислотные композиты. Изучена реакции присоединения

аминокислоты их композитов, пептидов и новое соединение 1,2- N, N' - бисаминотетраметил - 1,2 - n, n' - дихлордиметилэтилен к молекуле фуллерена C₆₀, их физико-химические и противовирусные свойства. Методика синтеза производных фуллерена C₆₀ на основе аминокислот, пептидов и их композиты, которую разработал и предложил сам автор является простой и легкодоступной.

Разработанную общую схему реакции получения аминокислотных производных фуллерена C₆₀, можно с успехом использовать для присоединения пептидов, полипептидов и их композиты к поверхности фуллерена. По данной схеме реакции диссертант синтезировал и охарактеризовал ряд производные фуллерена C₆₀ с аминокислотами, пептидами и их композитами.

Изучены противовирусные активности синтезированных производных фуллерена C₆₀ на основе композитов аминокислот, композиты аминокислот и пептидов в отношении вируса гепатита С.

Также рассматривается синтез трипептида Gly-L-Glu-L-Tyr-OH и гексапептида H-Gly-Leu-Gly-Arg-Arg-Gly-OH с целью присоединения их к фуллерену C₆₀. Данные пептиды синтезированы классическими методами пептидной химии в растворе с применением конденсирующих реагентов и защитных групп, для защиты функциональных групп, и снятия защитных групп после завершения синтеза. Фуллеро C₆₀(H)[Gly-Leu-Gly-Arg-Arg-Gly-ONa] было синтезировано исходя из фуллерена C₆₀ и свободного H-Gly-Leu-Gly-Arg-Arg-Gly-OH. Строение полученных соединений подтверждено Масс - спектроскопией, хроматографическим и электрофоретическим исследованиями.

Автор тщательно обсудил методику синтеза нового органического соединения фуллеро-1,2-N,N'-бисаминотетраметил - 1,2-n,n'-дихлордиметилэтилен. Данное соединений получено из диметилформамида и хлорбензола в щелочной среде нагреванием в течение 9-10 часов. Структура полученного соединения подтверждается УФ-, ИК-, ЯМР¹H, ЯМР ¹³C, масс-спектрометрии, а также элементными анализами. С помощью ВЭЖХ осуществлено хроматографическое разделение цис- и транс- изомеров 1,2-N,N'-бис-аминотетраметил-1,2-n,n'-дихлордифенилэтилена. С целью получения нанопрепаратов в медицине 1,2-N,N'-бис-аминотетраметил-1,2-n,n'-дихлордифенилэтилен модифицирован молекулой фуллерена C₆₀ и получено соединение: фуллеро C₆₀-1,2-N,N'-бисамино-тетраметил - 1,2-n,n'-дихлордиметилэтилен. Строение полученного соединения подтверждено УФ-Масс -, ЯМР ¹H, ЯМР ¹³C, ИК-спектроскопией, хроматографическим исследованием.

Четвертая глава (Исследование противовирусных свойств).

Противовирусная свойства полученных соединений изучалась в отношении инфекции вируса гепатита С. В работе использован наиболее патогенный генотип ВГС-Ib. В опытах использован вирус - содержащий культуральную жидкость, собранную из инфицированных культур фибробластов куриного эмбриона, содержащую 7.0 lg ТЦИД₅₀/мл инфекционного ВГС. В качестве положительного контроля использовали активный препарат в отношении инфекции, вызванной вирусом гепатита С, используемый в практическом здравоохранении – рибавирин. Исследование цитотоксических свойств аналогов фуллерена проводили путем воздействия различных концентраций соединений на монослой клеток *Vero(v)*, выращенный в 96 луночных пластиковых культуральных панелях. Противовирусная активность аналогов *in vitro* изучена микрометодом в соответствии с методом подавления цитопатогенного действия вируса гепатита С. Исследуемые вещества в разных концентрациях, были использованы в настоящем исследовании, были нетоксичны для клеток *Vero(v)*. Антивирусный эффект веществ оценивали по их способности предотвращать развитие инфекционного процесса в клетках. Было показано, что максимальная противовирусная активность вещества проявляется за 24 часа до заражения вирусом. В этом случае максимальной противовирусной активностью обладало вещество C₆₀(H)₂-[(Gly-Leu-Gly-Arg-Arg-GlyONa)₂].

Сформулированные соискателем выводы логично обосновываются на приведенных в диссертации литературных данных и результатами собственных исследований.

Содержание диссертационной работы Зафарова Сорбона Зафаровича, соответствует паспорту специальности 02.00.03- органическая химия:

п.1. Изучение строения и свойств органических соединений с использованием химических, физико-химических и физических методов исследования и теоретических расчётов. (Для подтверждения строения синтезированных соединений, автор применял УФ-, ИК-, ЯМР¹H, ЯМР¹³C, масс- спектральные методы анализа. Индивидуальность полученных соединений контролировалась тонкослойной хроматографией и ВЭЖХ в различных хроматографических системах, - глава 2 и 4 работы);

п.2. Изучение реакционной способности и механизмов реакций органических соединений. Теоретическое описание зависимостей между строением, свойствами и реакционной способностью органических соединений. (-найденны оптимальные условия взаимодействия фуллерена C₆₀ с аминокислотами, пептидами, композиции аминокислот и пептидов;

-разработаны селективный метод введения аминокислотных, пептидных фрагментов и их композиции в структуру фуллерена C₆₀, путём

модификации разных молекул названных соединений содержащие реакционноспособные нуклеофильные группы (NH_2 , NH);

-исследованы параметры цитотоксичности синтезированных производных фуллерена C_{60} .

п.3. Открытие новых реакций органических соединений и методов их исследования. (- разработан эффективный метод синтеза производных C_{60} на основе аминокислот, пептидов и 1,2- N,N^1 -бис-аминотетраметил-1,2- n,n^1 -дихлордифенилэтилена. Нетоксичность и противогепатитная активность данных соединений позволяют разработать различные лекарственные препараты на их основе глава 2 работы).

п.4. Препаративная органическая химия, разработка методов органического синтеза, его теории и практики, молекулярный дизайн, комбинаторная химия. (три синтезированные соединения, относящиеся к композитам аминокислот и пептидов с фуллереном C_{60} , обладают противогепатитной активностью в отношении вируса гепатита С- глава 4 работы);

В целом, диссертация представляет собой законченную научно-квалификационную работу, в которой на основании выполненных автором исследований получены практические результаты, совокупность которых можно квалифицировать как новое научное и прикладное достижение в области технологии неорганических веществ.

Однако, несмотря на указанные достоинства работы, к диссертации имеются следующие замечания:

1. В экспериментальной части логичнее было бы сначала привести синтез пептидов, а затем их производные с фуллереном.

2. Методики исследований изучения противовирусной активности следовало бы привести в экспериментальной части.

3. При синтезе фуллерен C_{60} - $\text{Glu}(\text{ONa})_2$ на схеме реакции показано, что у глутаминовой кислоты две аминогруппы, а в формуле глутаминовой кислоты одна аминогруппа.

4. При синтезе гексапептида сказано, что пептид синтезирован классическими методами пептидного синтеза. Но про классические методы синтеза пептидов в литературном обзоре ничего не сказано.

5. В диссертации имеются некоторые грамматические ошибки и опечатки, которые необходимо исправить.

В диссертационной работе не выявлено серьезных недостатков, которые могли бы негативно отразиться на научной и практической значимости диссертации и не умаляют достоинство диссертационной работы Зафарова С.З.

Диссертационная работа Зафарова Сорбона Зафаровича на тему: «Синтез, свойства фуллерена C_{60} с производными аминокислот и пептидов, а

также их противогепатитная активность» соответствует требованиям «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Республики Таджикистан от 26.11.2016г. №505, предъявляемым к кандидатским диссертациям. Полученные результаты работы вносят существенный вклад в развитие органической химии, а её автор достоин присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.03- органическая химия.

**Кандидат химических наук, доцент,
декан факультета инженерии и
современных производственных технологий
Дангаринского государственного
университета**


Олимов Р.А.

**Подпись к.х.н., доцента Р.А. Олимова
заверяю:**

Начальник управления кадров ДГУ



Джабори Н.Ч.

« 23 » 10 2021г.