

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
высшего образования «Уральский федеральный университет имени первого  
Президента России Б.Н. Ельцина»

*На правах рукописи*

**КОНЫШЕВА** Анастасия Владимировна

**СИНТЕЗ И ПРЕВРАЩЕНИЯ АЛКИЛИРОВАННЫХ  
1-ЦИАНО-2,3-СЕКОТРИТЕРПЕНОИДОВ**

1.4.3. Органическая химия

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Екатеринбург – 2023

Работа выполнена в лаборатории биологически активных соединений в Институте технической химии Уральского отделения Российской академии наук – филиале Федерального государственного бюджетного учреждения науки Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук

**Научный руководитель:** кандидат химических наук, доцент,  
**Гришко Виктория Викторовна**

**Официальные оппоненты:** **Катаев Владимир Евгеньевич,**  
доктор химических наук, профессор, Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук», г. Казань, главный научный сотрудник лаборатории фосфорсодержащих аналогов природных соединений;

**Волчо Константин Петрович,**  
доктор химических наук, профессор РАН, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск, главный научный сотрудник лаборатории физиологически активных веществ Отдела медицинской химии;

**Буравлёв Евгений Владимирович,**  
кандидат химических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр «Коми научный центр Уральского отделения Российской академии наук», обособленное подразделение Институт химии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук, г. Сыктывкар, старший научный сотрудник лаборатории органического синтеза и химии природных соединений

Защита диссертации состоится «05» июня 2023 г. 14-00 ч на заседании диссертационного совета УрФУ 1.4.06.09 по адресу: 620002, г. Екатеринбург, ул. Мира, 19, ауд. И-420 (зал Ученого совета).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина», <https://dissovet2.urfu.ru/mod/data/view.php?d=12&rid=4639>

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2023 года

Ученый секретарь  
диссертационного совета



Поспелова Татьяна Александровна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность и степень разработанности темы исследования.** Разработка методов синтеза новых физиологически активных соединений с минимальными побочными эффектами представляет теоретический и практический интерес для современной органической и медицинской химии. Широкий спектр биологических свойств, отсутствие токсичности и неограниченные возможности синтетической трансформации позволяют рассматривать вторичные метаболиты растительного происхождения, в частности, пентациклический тритерпеноид бетулин, в качестве привлекательной платформы для получения новых терапевтически перспективных агентов.

В литературе приводятся многочисленные данные о значительном повышении уровня биологической активности в результате тривиальной функционализации нативных полициклических тритерпеноидов. В этом плане примеры структурной модификации тритерпеноидов, направленные на сужение или расширение цикла А, изучены в меньшей степени. Согласно известным биосинтетическим схемам, в природе образованию биоактивных тритерпеноидов с пятичленным циклом А предшествует фрагментация кольца А, чаще всего по C(2)–C(3) связи. Идентичные подходы успешно используются в синтезе природных биологически активных А-пентациклических тритерпеноидов и их полусинтетических аналогов. Так, синтез природной анти-ВИЧ-1 активной эпицеанотовой кислоты осуществлен на основе более доступного полусинтетического 2,3-дикарбокси-2,3-секопроизводного бетулина. Кроме того, удобным методом получения новых циклических производных с биологическими свойствами служит введение в структуру А-секотритерпеноида нитрильной группы, способствующей повышению реакционного потенциала молекулы во внутримолекулярной циклизации за счет образования нитрил-аниона в условиях основного катализа. Таким образом, реакцией внутримолекулярной циклизации 2,3-секотритерпеновых альдегидонитрилов получены производные с фрагментом  $\alpha,\beta$ -алкеннитрила в пятичленном цикле А, обладающие выраженными антиретровирусными свойствами.

Известно, что присутствие нитрильной группы в структуре полусинтетических производных способствует значительному повышению уровня их фармакологического действия. В настоящее время на фармацевтическом рынке широко представлены препараты, структура действующего вещества которых включает нитрильную функцию в сочетании с ароматическими, алифатическими и алкеновыми фрагментами. Так, например, агенты с фрагментом алкеннитрила применяются в качестве противоопухолевых средств, в том числе эффективных в случаях лекарственно устойчивых новообразований.

В связи с этим актуальное значение имеют исследования, касающиеся направленного синтеза цианозамещенных А-секотритерпеноидов, их алкилирования, дальнейшей функционализации и структурной модификации в условиях внутримолекулярной циклизации с образованием перспективных интермедиатов и новых биологически активных соединений.

**Цель настоящей работы** – разработка методов синтеза и исследование реакционной активности С(3) алкилированных 1-циано-2,3-секотритерпеноидов в процессах внутримолекулярной циклизации, оценка противовирусных и цитотоксических свойств продуктов синтеза.

**Основные задачи исследования:**

- разработать методы синтеза 1-циано-2,3-секотритерпеновых С(3) метилзамещенных производных на основе 3-оксобетулина, метилового эфира бетулоновой кислоты и аллобетулона;
- исследовать процесс внутримолекулярной циклизации 1-циано-2,3-секотритерпеновых метилкетонов и их производных;
- изучить подходы к введению атома брома в А-секокольцо тритерпеновых метилкетонов и возможность последующей функционализации и внутримолекулярной циклизации бромзамещенных тритерпеноидов;
- разработать методы получения 2,3-секо-18 $\alpha$ H-олеананового и 2,3-секолупанового тритерпеноидов с фрагментом этилкетона, их дальнейшей трансформации и циклизации;
- оценить противовирусные и цитотоксические свойства полученных соединений.

**Научная новизна и теоретическая значимость исследований.** При выполнении исследования осуществлен синтез 64 ранее не описанных в литературе производных бетулина лупанового и олеананового типа. Для осуществления региоселективной структурной трансформации цикла А полициклических тритерпеноидов разработаны методы синтеза 3-алкил-3-оксо-1-цианозамещенных 2,3-секотритерпеноидов, основанные на алкилировании А-циклических гидроксимикетонов или 2,3-секотритерпеновых альдегидонитрилов в условиях реакции Гриньяра.

Исследованы основные закономерности реакции внутримолекулярной нитрил-анионной циклизации синтезированных 3-алкил-3-кетонов и их производных. Установлено, что внутримолекулярная С(1)–С(3) оксонитрильная циклизация алкилкетонов в условиях основного катализа (*t*-BuOK/*t*-BuOH) протекает региоселективно с сужением цикла А и формированием фрагмента  $\alpha,\beta$ -алкеннитрила в пятичленном кольце А тритерпеноидов. Циклизация бромпроизводных алкилкетонов в аналогичных условиях реализуется

преимущественно по нитрил-анионному пути и позволяет функционализировать шестичленное кольцо А тритерпеноидов фрагментом  $\alpha,\beta$ -алкенкетона. Показано, что в отличие от 3-метилзамещенного аналога внутримолекулярная циклизация бромзамещенного 3-этил-3-кетона протекает региоселективно с формированием C(1)–C(31) связи.

Установлено, что восстановление 3-метил-3-кетонов протекает стереоселективно с образованием (3*R*)-гидроксинитрилов, которые в условиях системы  $H_2SO_4/CH_3COOH$  претерпевают внутримолекулярную циклизацию с образованием шестичленных алкенкетонов и  $\epsilon$ -лактона. Согласно предложенному механизму, в качестве ключевых направлений данного процесса можно предположить кислотный гидролиз цианогруппы и дегидратацию гидроксильной функции с формированием карбокатиона и последующей 1,2-миграцией метильной группы. Образование из (3*R*)-гидроксинитрила соответствующего производного с фрагментом C(4) изопентена в условиях системы  $POCl_3/C_5H_5N$  также свидетельствует в пользу предложенного механизма.

Рентгеноструктурные данные новых тритерпеновых производных внесены в Кембриджский центр кристаллографических данных ([www.ccdc.cam.ac.uk](http://www.ccdc.cam.ac.uk)) под номерами CCDC 961397 (8a), 1940329 (8b), 961398 (10), 1833332 (16), 1833333 (18), 1833334 (27), 1546452 (36), 1833331 (51), 1857970 (57), 1857974 (58, 59), 1940328 (62a), 1940332 (65), 1940331 (67), 1940330 (68).

Исследованы противовирусные и противоопухолевые свойства синтезированных тритерпеноидов. В частности, отобран 3-метил-1-циано-19 $\beta$ ,28-эпокси-2,3-секо-2-нор-18 $\alpha$ H-олеан-3-он с ингибирующей активностью в отношении вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1) и герпеса простого I типа (ВПП-1), перспективный в качестве интермедиата для синтеза новых противовирусных агентов. По данным скрининга *in vitro* противоопухолевых свойств отобран цитотоксичный метиловый эфир 3-бромметил-3-оксо-1-циано-2,3-секо-2-норлуп-20(29)-ен-30-аль-28-овой кислоты, проапоптотический эффект которого связан с активацией каспаз 8, 3/7.

**Практическая значимость работы.** Разработаны альтернативные методы синтеза новых тритерпеновых производных, содержащих фрагменты метил- и этилкетона при C(4) атоме. Наиболее оптимальный способ синтеза позволяет получать в три стадии C(3) замещенные 2,3-секотритерпеновые алкилкетоны, в том числе 3-метил-1-циано-19 $\beta$ ,28-эпокси-2,3-секо-2-нор-18 $\alpha$ H-олеан-3-он, сочетающий вирусингибирующую активность в отношении ВПП-1 и ВИЧ-1 ( $EC_{50}$  45,1 и 15,4 мкМ; ХТИ 10,4 и 9,4 соответственно).

Синтезированные 3-алкилзамещенные 2,3-секотритерпеноиды апробированы в условиях реакции внутримолекулярной оксонитрильной циклизации. В результате

впервые получена серия 3-алкилзамещенных А-пентациклических  $\alpha,\beta$ -алкеннитрилов, среди которых в качестве активного соединения отобран метиловый эфир 3-метил-1-циано-2-норлуп-1(3),20(29)-диен-28-овой кислоты с умеренными вирусингибирующими свойствами в отношении ВИЧ-1 ( $EC_{50}$  83,6 мкМ) на фоне высокого химиотерапевтического индекса (ХТИ 93,7).

Установлено, что восстановление 3-метил-3-кетонів протекает стереоселективно с образованием (3*R*)-гидроксипроизводных, среди продуктов превращения которых выявлен (3*R*)-3-ацетокси-3-метил-1-циано-19 $\beta$ ,28-эпокси-2,3-секо-2-нор-18 $\alpha$ H-олеанан, активный в отношении ВГП-1 ( $EC_{50}$  39,5 мкМ, ХТИ 22,5). В условиях кислотного гидролиза ( $H_2SO_4/CH_3COOH$ ) (3*R*)-гидроксинитрил подвергается внутримолекулярной циклизации с образованием семичленного лактона и шестичленных алкенкетонів.

Предложен эффективный метод введения атома брома в С(3) положение 3-алкил-3-кетонів, с использованием которого синтезирован противоопухолевый агент – метиловый эфир 3-бромметил-3-оксо-1-циано-2,3-секо-2-норлуп-20(29)-ен-30-аль-28-овой кислоты, цитотоксичный ( $IC_{50}$  0,8–25,4 мкМ) в отношении 11 линий культур опухолевых клеток, в т.ч. с множественной лекарственной устойчивостью. Использование 3-бромпроизводных 3-алкил-3-кетонів в реакциях внутримолекулярной циклизации позволяет осуществить синтез тритерпеноидов с фрагментами алкенкетона или гидрокси-алкеннитрила в кольце А.

Синтезированные тритерпеновые производные с ингибирующими свойствами в отношении ВГП-1 и ВИЧ-1 могут быть использованы в дальнейшей разработке на их основе новых противовирусных агентов. Метиловый эфир 3-бромметил-3-оксо-1-циано-2,3-секо-2-норлуп-20(29)-ен-30-аль-28-овой кислоты, острая токсичность ( $LD_{50}$ ) которого *in vivo* составляет более 2000 мг/кг, представляет интерес в качестве терапевтически перспективного противоопухолевого агента и требует дополнительных биологических испытаний.

**Методология и методы исследования.** Основной предшественник для синтетических модификаций, бетулин, выделяли с помощью традиционного для природных соединений метода экстракции. Трансформацию бетулина и его производных проводили с использованием приемов классической и современной органической химии, включая реакции алкилирования по Гриньяру, фрагментации по Бекману, внутримолекулярной нитрил-анионной циклизации, лактонизации, дегидратации, озонолиза и окислительно-восстановительного превращения. Выделение, аналитический контроль и структурную идентификацию продуктов синтеза осуществляли с применением методов экстракции, тонкослойной, колоночной, флеш- и высокоэффективной жидкостной хроматографии, рентгеноструктурного анализа, хромато-масс-спектрометрии, ИК и ЯМР

спектроскопии, поляриметрии. Исследование цитотоксической активности продуктов синтеза *in vitro* в отношении опухолевых клеток человека рабдомиосаркомы RD TE32, меланомы MS, немелкоклеточной карциномы легких A549, колоректальной карциномы HCT116, карциномы гортани HEp-2, аденокарциномы молочной железы MCF-7, карциномы простаты PC-3, а также нераковых клеток почки эмбриона человека HEK293, проводили с помощью стандартного МТТ-теста на базе «ИТХ УрО РАН» (г. Пермь). Дополнительное испытание цитотоксичности соединения-лидера в отношении опухолевых клеточных линий рака молочной железы HBL100, хронического миелолейкоза K562, рака ротовой полости KB-3-1 и их устойчивых к доксорубину вариантов – клеток рака молочной железы HBL/Dox, хронического миелолейкоза iS9 и рака ротовой полости KB-8-5 проводили на базе ФГБУН «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (г. Москва). Противовирусные свойства соединений в отношении ВИЧ-1 и ВГП-1 изучали на базе РНПЦ эпидемиологии и микробиологии Минздрава Республики Беларусь (г. Минск).

#### **Положения, выносимые на защиту.**

1. В синтезе 2,3-секотритерпеноидов с фрагментами метил- и этилкетона в качестве исходных соединений для восстановительного алкилирования в условиях реакции Гриньяра целесообразно использовать А-гексациклические тритерпеновые  $\alpha$ -кетоксимы.
2. Внутримолекулярная региоселективная оксонитрильная циклизация 2,3-секотритерпеновых алкилкетонов с образованием А-пентациклических  $\alpha,\beta$ -алкеннитрилов реализуется в условиях основного катализа в системе *t*-BuOK/*t*-BuOH.
3. В условиях основного катализа нитрил-анионная циклизация  $\alpha$ -бромметилкетона протекает с образованием А-пентациклического  $\alpha,\beta$ -алкеннитрила с гидроксильной группой в  $\gamma$ -положении, тогда как  $\alpha$ -бромэтилкетон циклизуется в шестичленный алкенкетон.
4. В зависимости от используемой системы (POCl<sub>3</sub>/C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>N или H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/CH<sub>3</sub>COOH) вторичный спирт (3*R*)-3-гидрокси-3-метил-1-циано-19 $\beta$ ,28-эпокси-2,3-секо-2-нор-18 $\alpha$ H-олеанана претерпевает дегидратацию и/или внутримолекулярную циклизацию.
5. Синтезированные тритерпеновые производные перспективны для разработки противовирусных и противоопухолевых агентов.

**Степень достоверности и апробация результатов.** Работа была выполнена с использованием оборудования ЦКП «Исследования материалов и вещества»

ПФИЦ УрО РАН и ЦКП «Центр коллективного пользования уникальным научным оборудованием ПГНИУ». Структуры новых соединений установлены на основании данных ИК, ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  спектроскопии, включая данные спектров гомоядерной  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  корреляции и гетероатомной  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  корреляции на прямых и дальних константах спин-спинового взаимодействия. Структуры пятнадцати соединений подтверждены данными РСА, полный набор кристаллографических данных которых депонирован в Кембриджской базе структурных данных.

Основные положения диссертации представлены на международных и российских конференциях: IX Всероссийской конференции «Химия и медицина» (Уфа, 2013); X и XII International symposium on the chemistry of natural compounds (Bukhara, 2013; Tashkent, 2017); Уральском научном форуме «Современные проблемы органической химии», XVII Молодежной школе-конференции по органической химии (Екатеринбург, 2014); V Международной конференции «Техническая химия. От теории к практике» (Пермь, 2016); Кластере конференций по органической химии «ОргХим-2016» (Санкт-Петербург, 2016); X Всероссийской научной конференции и школы молодых ученых «Химия и технология растительных веществ» (Казань, 2017); V Всероссийской конференции с международным участием «Енамины в органическом синтезе» (Пермь, 2017); II Международной научной конференции «Высокие технологии, определяющие качество жизни» (Пермь, 2018); XI Всероссийском конгрессе молодых ученых-биологов с международным участием «Симбиоз-Россия 2019» (Пермь, 2019).

**Публикации.** По теме диссертационной работы опубликовано 25 печатных работ, в том числе 11 статей в рецензируемых научных журналах, рекомендуемых ВАК РФ и входящих в международные базы цитирования WoS и Scopus; глава в монографии, 2 патента РФ.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 182 страницах машинописного текста, содержит 6 таблиц, 18 рисунков, 49 схем. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, обсуждения результатов, экспериментальной части, заключения и списка цитируемой литературы, включающего 181 наименование работ отечественных и зарубежных авторов.

**Связь работы с научными программами и собственный вклад соискателя.** Работа выполнена в соответствии с планом НИР «ИТХ УрО РАН» и является частью исследований, проводимых по теме «Оптически активные терпеноиды в синтезе практически значимых соединений и материалов медицинского назначения» (№ АААА-А18-118030790037-7). Работа поддержана грантами ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2013 годы» (№



11.519.11.2033), Российского научного фонда (№ 16-13-10245), Российского фонда фундаментальных исследований (№ 13-03-00629, № 14-03-00256, № 16-03-00865), программы УрО РАН «Фундаментальные науки – медицине» (№ 18-7-3-4).

Соискателем осуществлены дизайн и синтетические трансформации полициклических терпеноидов, выделение, очистка и идентификация продуктов синтеза. Проведен анализ противовирусной и противоопухолевой активности синтезированных соединений, выявлена взаимосвязь биологических свойств и структуры тритерпеноидов. Выполнен аналитический обзор литературных данных и подготовка научных публикаций по теме исследования.

### ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В литературном обзоре представлен анализ сведений о природных источниках биологически активных тритерпеноидов с пятичленным циклом А и методах синтеза их структурных аналогов.

В обсуждении результатов рассмотрены данные исследований по разработке методов синтеза, направленной химической модификации и внутримолекулярной циклизации 2,3-секотритерпеноидов с фрагментами метил- и этилкетона. Представлены данные о противовирусных и противоопухолевых свойствах продуктов синтеза и анализ влияния их структуры на биологическую активность.

**Синтез 2,3-секотритерпеновых 3-алкил-3-кетонов.** В рамках настоящего исследования на основе полученных ранее в лаборатории биологически активных соединений «ИТХ УрО РАН» – гидроксиминокетонов метилового эфира бетулоновой кислоты **1** и аллобетулона **2** – разработаны альтернативные методы синтеза перспективных интермедиатов – 2,3-секотритерпеноидов с фрагментами метил- **9**, **10** и этил- **17**, **18** кетона (Схема 1).

Пятистадийный способ (Схема 1) в качестве ключевых стадий включает взаимодействие синтезированных по известной методике 2,3-секотритерпеновых альдегидонитрилов **5**, **6** с реактивом Гриньяра и последующее окисление смеси образующихся эпимерных спиртов **7а,б** (соотношение 2,5:1), **8а,б** (соотношение 2:1) до целевых 2,3-секометилкетонов **9**, **10**. Ацилированием спиртов **7а**, **8а** и **7б**, **8б** получены соответствующие ацетаты **11а**, **12а** и **11б**, **12б**.

Трехстадийный метод (Схема 1) основан на восстановительном алкилировании в условиях реакции Гриньяра гидроксиминокетонов **1**, **2** с образованием, в зависимости от алкилирующего агента ( $\text{CH}_3\text{MgI}$  или  $\text{C}_2\text{H}_5\text{MgBr}$ ), 3 $\beta$ -гидрокси-3 $\alpha$ -метил- **13**, **14** или 3 $\beta$ -гидрокси-3 $\alpha$ -этил- **15**, **16** производных, фрагментация по Бекману которых приводит к целевым 2,3-секотритерпеновым метил- **9**, **10** и этил- **17**, **18** кетонам, соответственно.

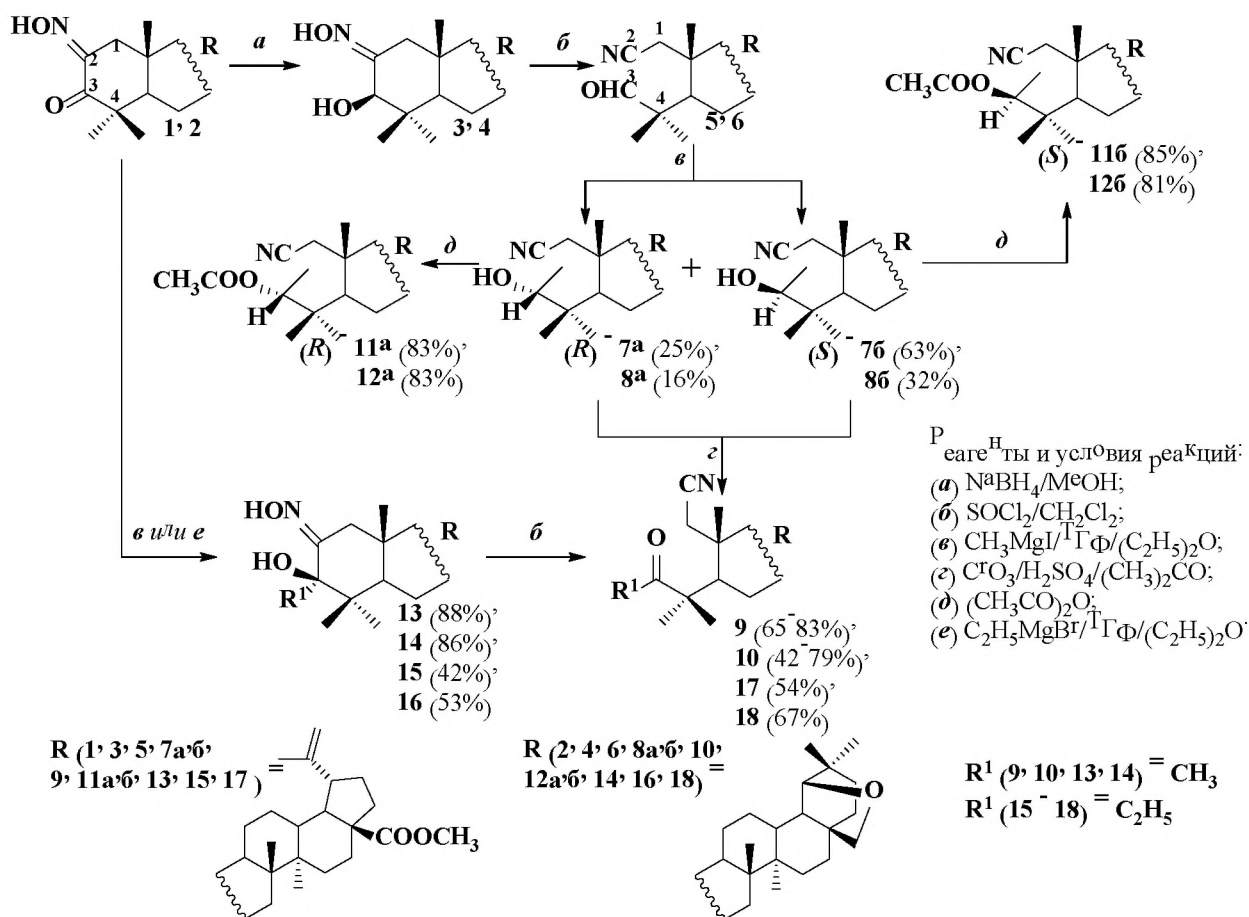
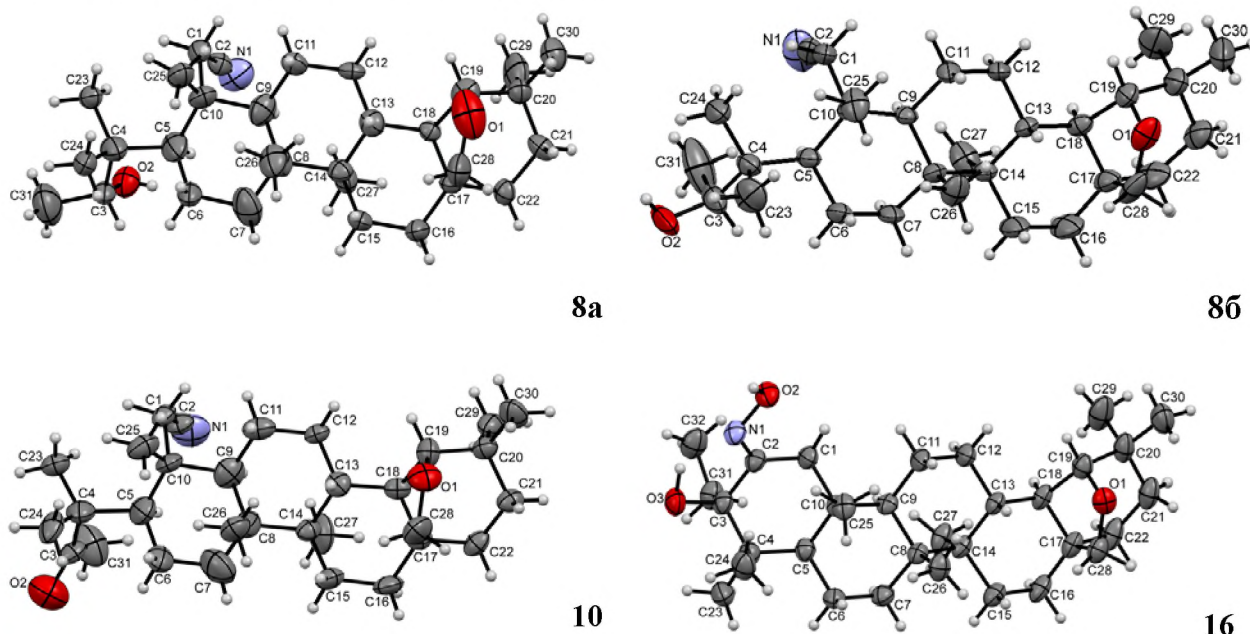
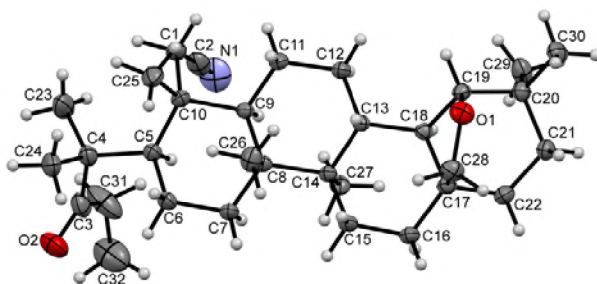


Схема 1

Структуры полученных тритерпеновых производных определены на основании данных спектров ИК, ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$ . Абсолютная структура и конфигурация асимметрических центров подтверждены данными РСА для соединений **8a**, **8б**, **10**, **16** и **18** (Рисунок 1).





18

Рисунок 1 – Структуры соединений **8a**, **8б**, **10**, **16** и **18** по данным РСА

На основе 2-гидроксимино-3-оксобетулина **19** синтезирован 2,3-секометилкетон **23** лупанового типа с гидроксильным заместителем при С(28) атоме (Схема 2). Для защиты 28-гидроксильной функции гидроксимикетона **20** в реакции С(2)–С(3) фрагментации по Бекману использована бензоильная группа, которую удаляли щелочным гидролизом с образованием целевого 28-гидроксиметилкетона **23**.

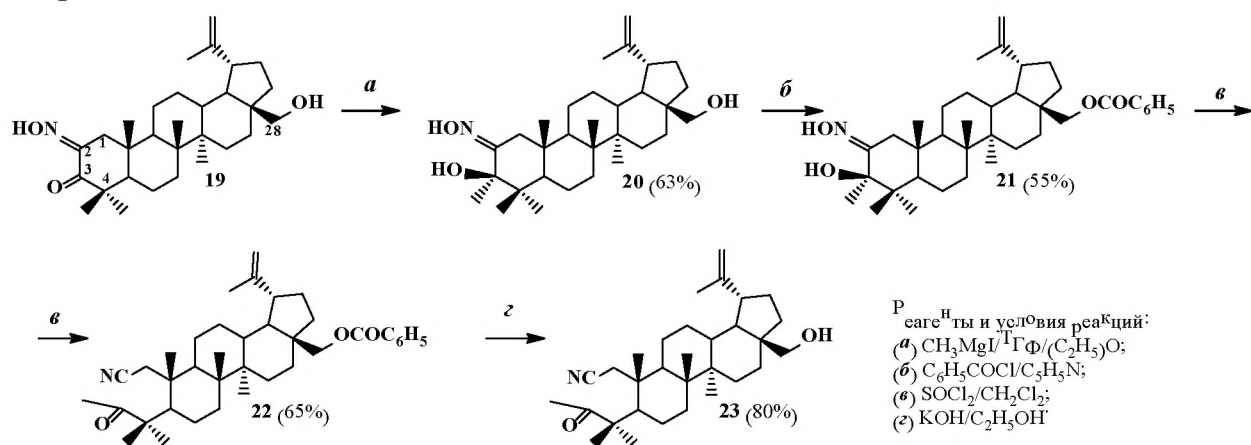
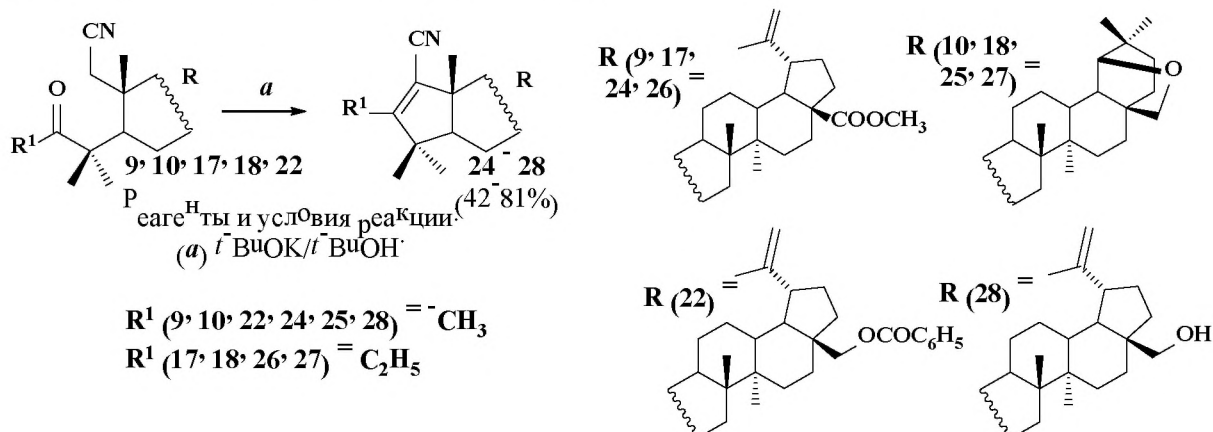


Схема 2

**Внутримолекулярная циклизация 3-алкил-3-кетон**ов и модификация продуктов синтеза. Реакция внутримолекулярной оксонитрильной циклизации 2,3-секотритерпеновых 3-метил-3-кетонов **9**, **10**, **22** и 3-этил-3-кетонов **17**, **18** в системе *t*-BuOK/*t*-BuOH протекает хемоселективно, с сужением цикла А и образованием А-пентациклических 3-метил- **24**, **25**, **28** и 3-этил- **26**, **27** замещенных  $\alpha,\beta$ -алкеннитрилов, соответственно (Схема 3).





### Схема 3

В случае метилкетона **22** в условиях основного катализа протекает гидролитическое отщепление C(28) бензоильной защиты с образованием  $\alpha,\beta$ -алкеннитрила **28** с 28-гидрокси-группой. Строение соединений **24-28** подтверждено данными РСА (Рисунок 2) на примере структуры  $\alpha,\beta$ -алкеннитрила **27**.

Возможность гидролитического и восстановительного превращения циано-группы 3-метилзамещенных  $\alpha,\beta$ -алкеннитрилов **24**, **25** исследована в сравнении с их незамещенными известными аналогами **29**, **30** (Схема 4). Установлено, что при длительном кипячении в основных условиях нитрильная группа алкеннитрилов **24**, **25**, **29**, **30** подвергается гидролизу с образованием  $\alpha,\beta$ -ненасыщенных А-пентациклических кислот **31-34**. При этом выход незамещенных продуктов **33** (38%), **34** (35%) превосходит таковой 3-метилзамещенных аналогов **31** (24%), **32** (13%). В условиях восстановления цианогруппы реактивом DIBAL-H в различных режимах температуры, соотношения реагентов или растворителя алкеннитрилы **24**, **25**, **29** оставались инертными. Только при введении в реакцию незамещенного 18 $\alpha$ H-олеананового  $\alpha,\beta$ -алкеннитрила **30**, независимо от условий реакции, зарегистрировано селективное образование амина **35** с выходом 41%.

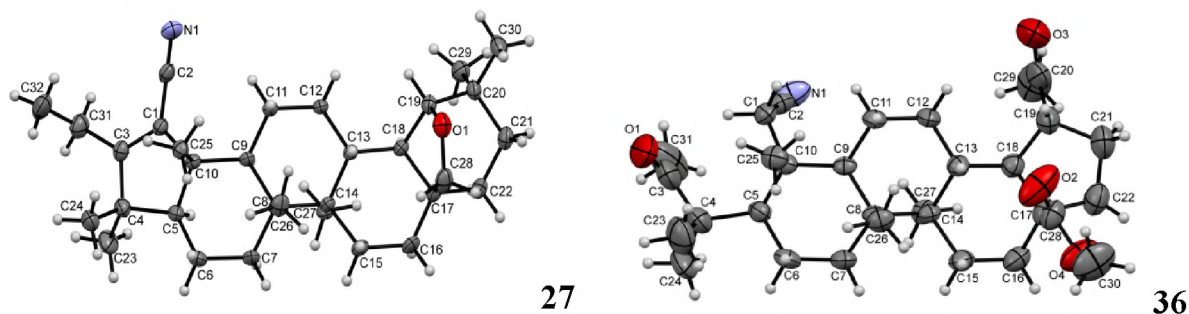
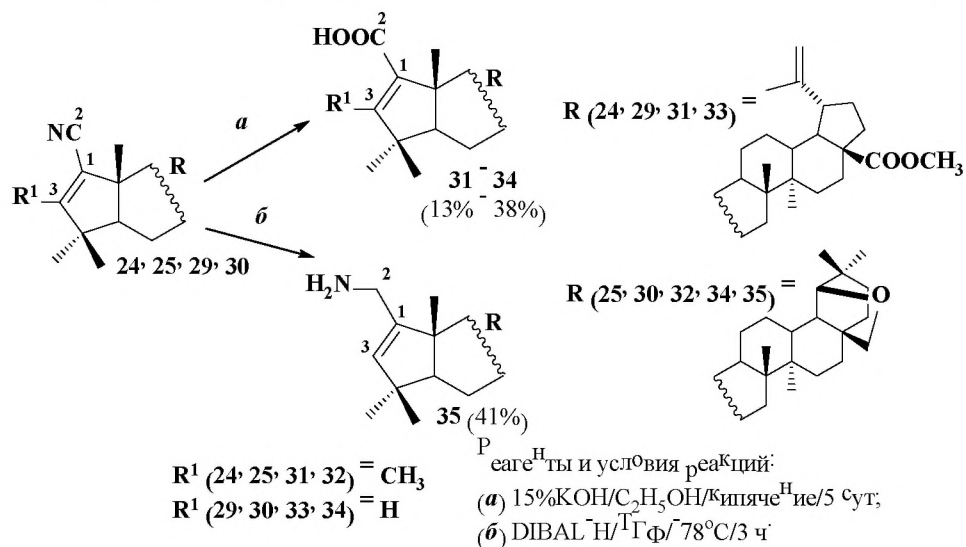


Рисунок 2 – Структуры соединений **27** и **36** по данным РСА



### Схема 4

В синтезе лупановых А-пентациклических производных с модифицированным фрагментом изопропилидена использовано два подхода:

окислительная трансформация исходных метилкетона **9** и этилкетона **17** с дальнейшей внутримолекулярной оксонитрильной циклизацией или прямое окисление А-пентациклических  $\alpha,\beta$ -алкеннитрилов. Так, путем озонолитического окисления алкилкетонов **9**, **17** осуществлено расщепление двойной связи С(20)–С(29) с образованием соответствующих дикетонов **36**, **37**, а введение альдегидной группы в положение С(30) реализовано в условиях окисления селенистой кислотой алкилкетонов **9**, **17** до альдегидов **40**, **41** (Схема 5). Структуры соединений **36**, **37** подтверждены данными РСА для соединения **36** (Рисунок 2). Внутримолекулярной оксонитрильной циклизацией алкилкетонов **36**, **37** и **40** в условиях основного катализа получены соответствующие А-пентациклические  $\alpha,\beta$ -алкеннитрилы **38**, **39**, **42**.

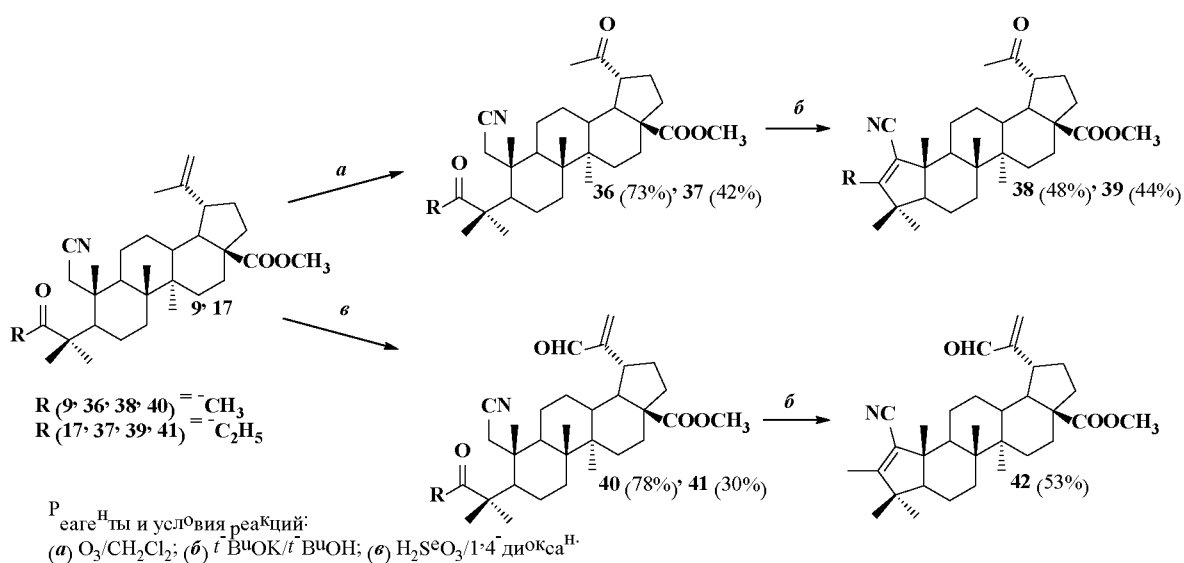
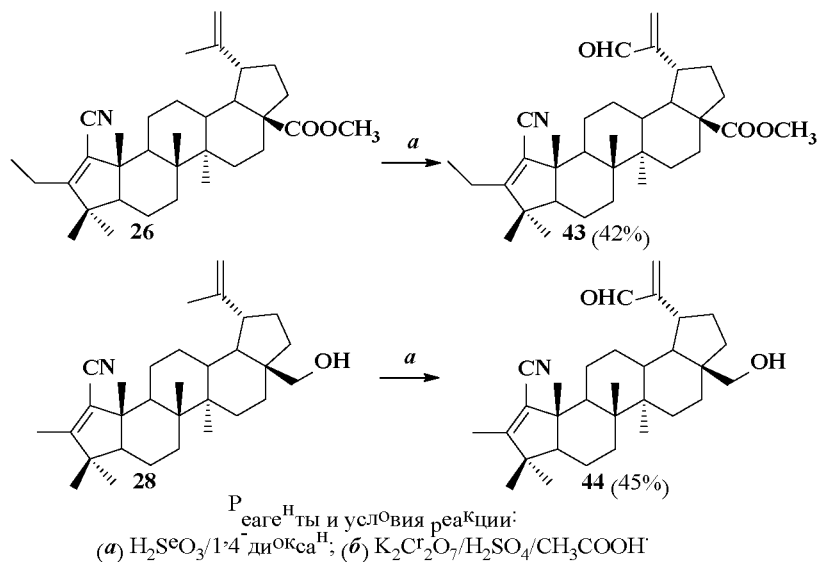


Схема 5

На примере 3-этилзамещенного  $\alpha,\beta$ -алкеннитрила **26** и 28-гидроксиупанового  $\alpha,\beta$ -алкеннитрила **28** показана возможность прямого окисления С(30) положения фрагмента изопропилидена с образованием соответствующих альдегидов **43**, **44** (Схема 6).



### Схема 6

Синтез и циклизация бромзамещенных 3-алкил-3-кетонов. Подобраны условия синтеза на основе метилкетонов **9**, **10** соответствующих  $\alpha$ -монобромпроизводных **45**, **46** (Схема 7). Для исключения участия в реакции бромирования изопропилиденового фрагмента лупанового метилкетона в качестве исходного соединения в реакции использовали метилкетон **40** с альдегидной группой в положении C(30). Максимальный выход (70-73%) целевых монобромметилкетонов **45**, **46** был достигнут при проведении реакции в условиях комнатной температуры и постепенном добавлении эквимолярного количества бромлирующего агента – перброма пиридинийброма ( $C_5H_6Br_3N$ ). При этом в качестве минорных продуктов в реакционной смеси образовывались также дибромпроизводные **47**, **48**, выход которых может быть увеличен до 20-27% в условиях однократного добавления эквимолярного количества  $C_5H_6Br_3N$  и последующего нагревания реакционной смеси в течение 6 ч. В случае 3-этил-3-кетонов **18**, **41**, как и следовало ожидать, реакция бромирования протекала селективно с образованием соответствующих  $\alpha$ -монобромпроизводных **49**, **50**.

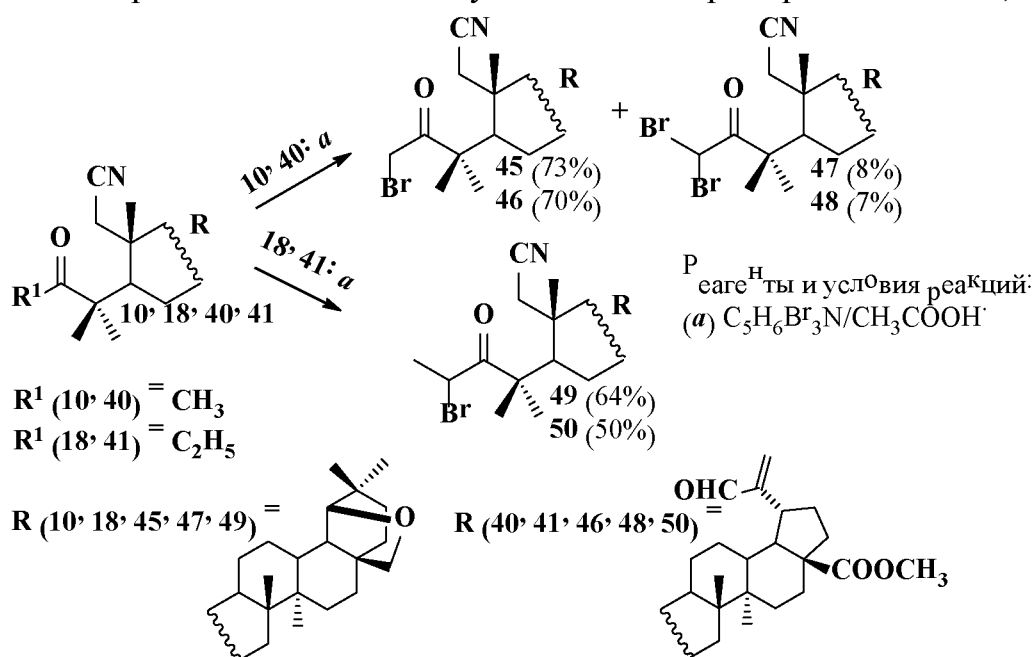


Схема 7

В условиях системы *t*-BuOK/*t*-BuOH внутримолекулярная C(1)–C(31) нитрил-анионная циклизация олеананового 31-бром-3-этил-3-кетона **49** протекала селективно с отщеплением циано-группы и формированием А-гексациклического 2-метилзамещенного алкенкетона **51** (Схема 8), структура которого подтверждена методом РСА

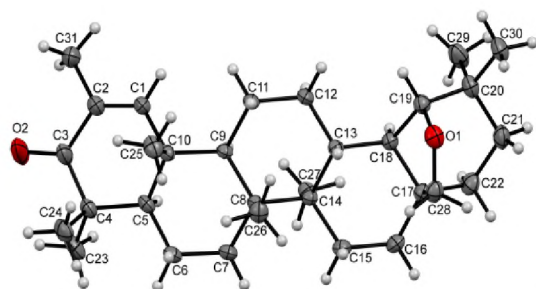


Рисунок 3 – Структура соединения **51** по данным РСА

(Рисунок 3). В результате циклизации бромметилкетона **45** в условиях системы *t*-BuOK/*t*-BuOH из реакции выделены А-гексациклический енон **52** и смесь трудноразделимых компонентов, в то время как при использовании системы KOH/этанол реакция протекала по оксонитрильному пути с образованием  $\gamma$ -гидрокси-алкеннитрила **53**. При обработке основными системами лупановых бромзамещенных алкилкетонов **46**, **50** образуется трудноразделимая многокомпонентная смесь.

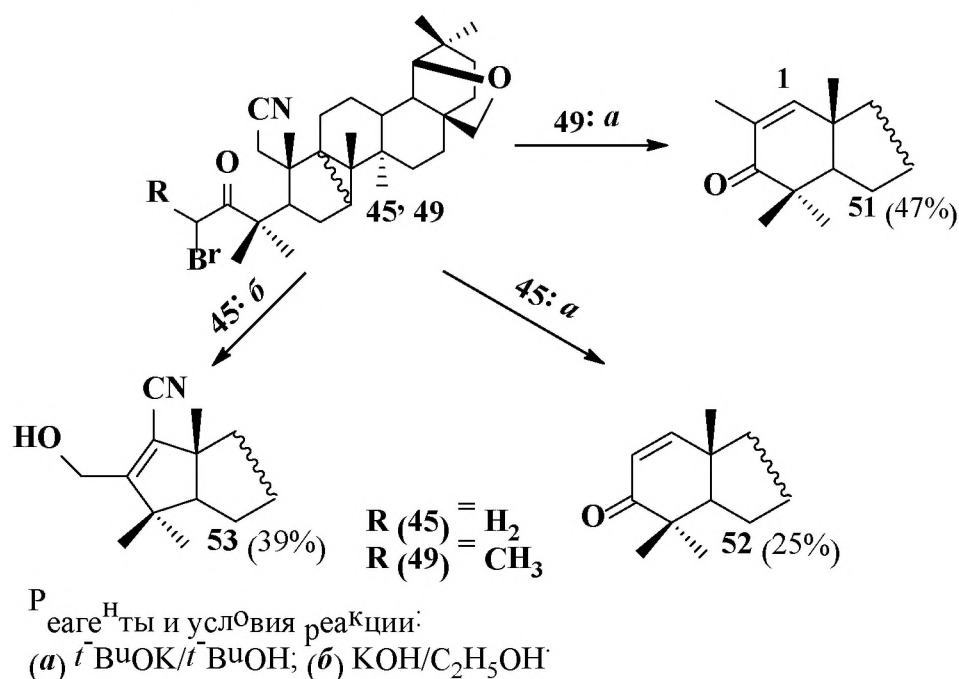


Схема 8

Длительным кипячением (12 ч)  $\alpha$ -монобромметилкетона **45** с уксусной кислотой (Схема 9) получен кетоэфир **54** (45%), а также продукт его гидролиза –  $\alpha$ -кетоспирт **55** (37%). Использование микроволнового синтеза позволило значительно сократить время реакции (до 1 ч), тем самым исключить образование  $\alpha$ -гидроксикетона **55** и увеличить выход целевого продукта **54** до 75%. Восстановление  $\alpha$ -гидроксикетона **55** NaBH<sub>4</sub> в метаноле приводило к образованию неразделимой



смеси 3-гидрокси-эпимеров **57** (соотношение 3:1, данные ЯМР  $^1\text{H}$ ). Внутримолекулярная оксонитрильная циклизация 2,3-секо-18 $\alpha$ H-олеананового кетозфира **54** с образованием А-пентациклического (1R,3R)-изомерного дигидроксинитрила **57** протекала в условиях системы KOH/C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH. Абсолютная структура соединения **57** определена методом РСА (Рисунок 4). В стандартных условиях оксимирования олеанановый бромметилкетон **45** оставался инертным. В условиях нитрозирования (*i*-C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>ONO/HCl/CCl<sub>4</sub>) соединения **45** получены гетеро- и гомодигалогенированные продукты. В результате реакции выделена неразделимая смесь 31,31-дихлор- **58** и 31-бром-31-хлор- **59** геминальных производных с общим выходом 56% (соотношение 3:2, данные ЯМР  $^1\text{H}$ ). Структуры дигалогенидов **58** и **59**, а также конфигурация нового хирального (31S)-центра гетерогалогенида **59** определены методом РСА (Рисунок 4).

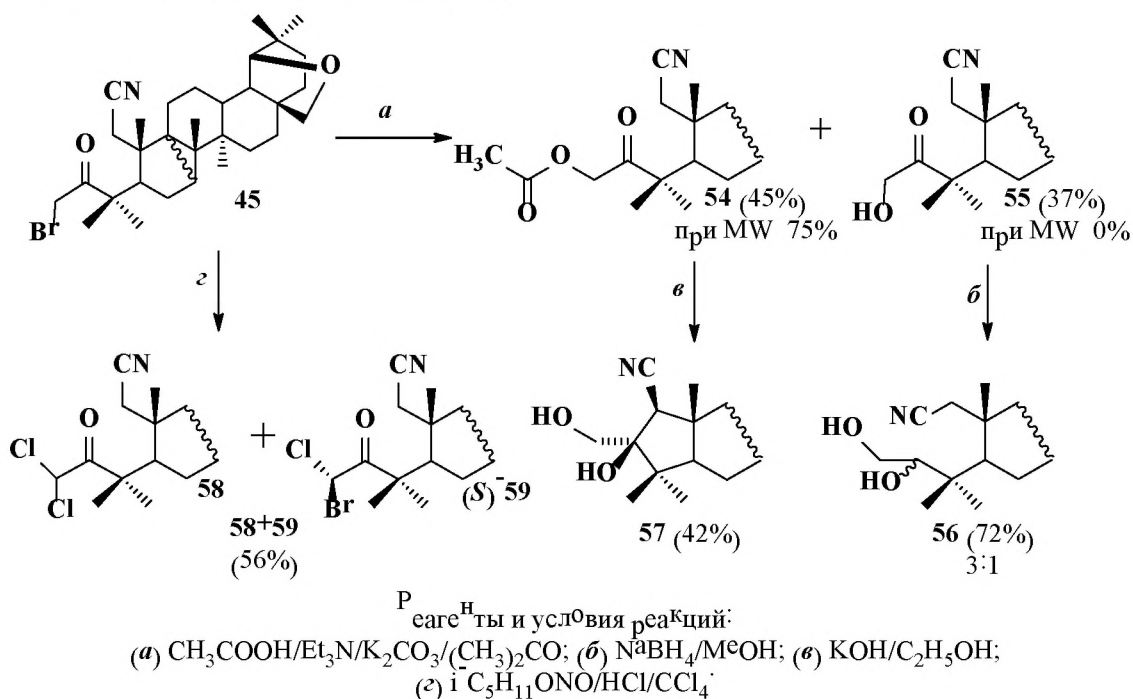


Схема 9

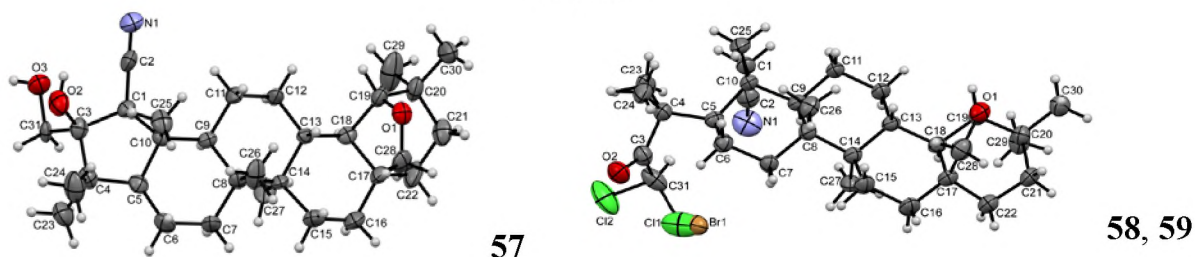


Рисунок 4 – Структуры соединений **57**, **58** и **59** по данным РСА

**Синтез и превращения (3R)-3-гидрокси-3-метил-1-циано-19 $\beta$ ,28-эпокси-2,3-секо-2-нор-18 $\alpha$ H-олеанана.** Установлено, что восстановление 2,3-секо-олеананового метилкетона **10** под действием NaBH<sub>4</sub> протекает стереоселективно с образованием (3R)-гидроксипроизводного **8a** (Схема 10). При использовании в качестве дегидратирующего агента SOCl<sub>2</sub> происходит 1,2-миграция C(24)



метильной группы, в результате которой образуется смесь алкенов **60**, **61** в соотношении 7:3 (данные ХМС), тогда как при использовании  $\text{POCl}_3$  регистрируется селективное образование алкена **60**. В результате длительного кипячения (3 сут) алкена **60** в толуоле в присутствии *m*-CPBA/KF/ДАК получена смесь эпоксидов **62a** и **62б**, которые выделены в виде индивидуальных диастереомеров методом колоночной хроматографии. Относительная конфигурация асимметрического атома C(4) эпоксидов определена на основании данных РСА для эпимера **62a** (Рисунок 5). Озонолизом 2,3-алкена **60** с C(4) экзометиленовой связью синтезирован соответствующий изопропилкетон **63**. Окисление соединения **60** системой  $\text{POCl}_3/\text{AlCl}_3/\text{DMF}$  привело к раскрытию 19 $\beta$ ,28-эпоксидного цикла и образованию 28-хлорпроизводного **64**.

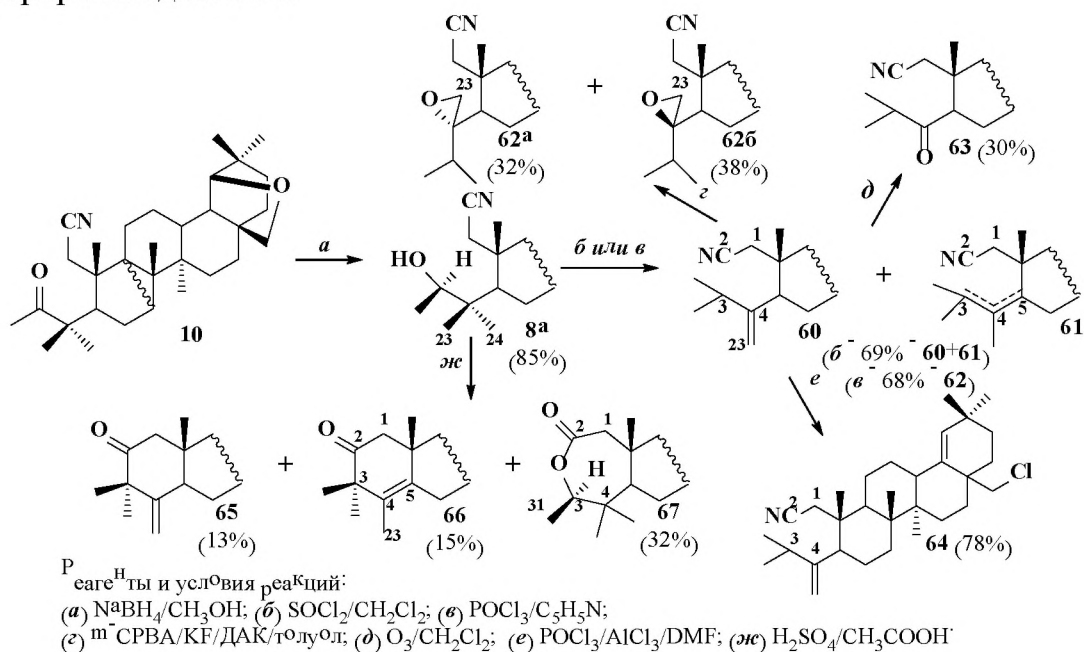
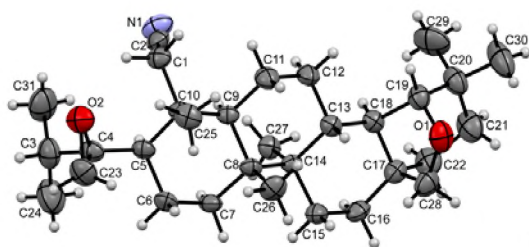
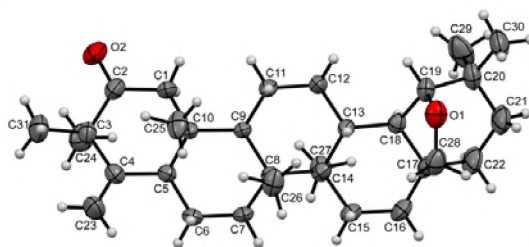


Схема 10



62a



65

Рисунок 5 – Структуры соединений **62a** и **65** по данным РСА

Нагреванием олеананового гидроксинитрила **8a** в условиях системы  $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{CH}_3\text{COOH}$  получена смесь шестичленных алкенкетонов **65**, **66** и семичленного (3*R*)-изомерного лактона **67**. Образование оппозитного (3*S*)-лактона **68** (Рисунок 6) наблюдали при использовании в качестве исходного (3*S*)-спирта **8б**. Абсолютная структура алкенкетона **65** (рисунок 5) и лактонов **67**, **68** (Рисунок 7) подтверждена методом РСА.

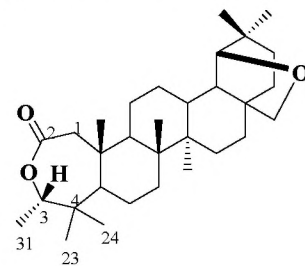


Рисунок 6 – (3*S*)-Лактон **68**

Возможный механизм реакции включает процессы кислотного гидролиза циано-группы, образования карбокатиона с последующей анионотропной 1,2-миграцией C(24) метильной группы, дегидратации и внутримолекулярной циклизации.

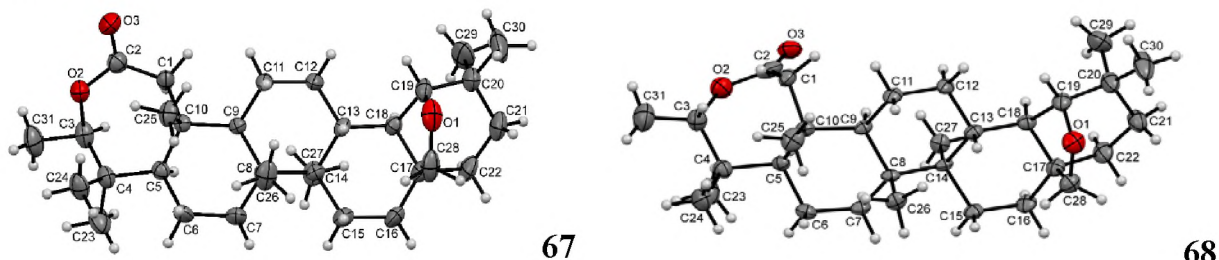


Рисунок 7 – Структура соединений **67** и **68** по данным РСА

В результате исследования противовирусных и цитотоксических свойств среди продуктов синтеза отобрано два соединения-лидера: 3-метил-1-циано-19 $\beta$ ,28-эпокси-2,3-секо-2-нор-18 $\alpha$ H-олеан-3-он **10**, сочетающий высокий уровень ингибирующей активности в отношении ВИЧ-1 (EC<sub>50</sub> 15,4 мкМ, ХТИ 9,4) и вируса герпеса простого I типа (EC<sub>50</sub> 45,1 мкМ, ХТИ 10,4) и представляющий интерес для дальнейшей разработки на его основе новых противовирусных агентов; а также противоопухолевый агент 5 класса опасности (LD<sub>50</sub> >2000 мг/кг) – метиловый эфир 3-бромметил-3-оксо-1-циано-2,3-секо-2-норлуп-20(29)-ен-30-аль-28-овой кислоты **46**, проявляющий высокую (IC<sub>50</sub> 0,8–25,4 мкМ) цитотоксическую активность в отношении опухолевых клеток линий Нер-2, НСТ 116, MS, RD TE32, A549, HBL100, K562, KB-3-1, а также клеток с множественной лекарственной устойчивостью линий HBL/Dox, iS9, KB-8-5, механизм цитотоксического действия которого реализуется по не митохондриальному пути с активацией каспаз **8**, 3/7.

**Благодарности.** Автор выражает глубокую признательность всем коллегам и партнерам, участвующим в исследованиях по данному направлению. Всему коллективу лаборатории биологически активных соединений «Института технической химии», особенно к.х.н. Толмачевой И.А., к.х.н. Крайновой Г.Ф. и к.б.н. Ерошенко Д.В. Самую глубокую и искреннюю благодарность автор выражает своему научному руководителю к.х.н., доценту Гришко Виктории Викторовне за терпение, постоянную заботу и неоценимую помощь, проявленные во время работы и написания диссертации.

Особую благодарность автор выражает руководителю группы РСА ИОС УрО РАН, к.х.н. П.А. Слепухину (соединения **8a**, **10**) и н.с. кафедры органической химии ПГНИУ, к.х.н. М.В. Дмитриеву (соединения **8b**, **16**, **18**, **27**, **36**, **51**, **57-59**, **62a**, **65**, **68**) за проведение рентгеноструктурного анализа; доценту лаборатории «Комплексных исследований и экспертной оценки органических материалов» УрФУ им. первого Президента России Б.Н. Ельцина к.х.н. Ельцову О.С. за проведение двумерной ЯМР спектроскопии для соединений **8a** и **8b** и расшифровку полученных данных.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. На примере 2,3-секотритерпеновых метилкетонов продемонстрирована возможность альтернативных подходов к синтезу 2,3-секотритерпеноидов с фрагментом алкилкетона, включающих в качестве ключевой стадии восстановительное алкилирование в условиях реакции Гриньяра 2,3-секотритерпеновых альдегидонитрилов или тритерпеновых  $\alpha$ -кетоксимов.

2. Установлено, что в условиях основного катализа внутримолекулярная оксонитрильная циклизация 2,3-секотритерпеновых метилкетонов протекает с сужением кольца А тритерпеноидов и формированием С(1)–С(3) двойной связи, что приводит к образованию А-пентациклических 3-метилзамещенных  $\alpha,\beta$ -алкеннитрилов. Циклизация в кислотных условиях продуктов восстановления метилкетона – эимерных  $\epsilon$ -гидроксинитрилов приводит к образованию гексациклических  $\beta$ -енонов и  $\gamma$ -лактонам.

3. Показано, что в условиях дегидратации (3*R*)-3-гидрокси-3-метил-1-циано-19 $\beta$ ,28-эпокси-2,3-секо-2-нор-18 $\alpha$ H-олеанана под действием  $\text{POCl}_3/\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$  протекает формирование карбокатиона с последующей 1,2-миграцией С(24) метильной группы и преимущественным образованием С(4) изопентенового фрагмента в структуре 2,3-секотритерпеноида, озонированием и эпоксидированием двойной связи которого получены 2,3-секопроизводные с фрагментами изопропилкетона или 4,23-эпоксида, соответственно.

4. Осуществлен синтез 3-бромметил- и 3-ацилоксиметилзамещенных производных 2,3-секо-18 $\alpha$ H-олеананового метилкетона, региоселективная оксонитрильная С(1)–С(3) циклизация которых с формированием фрагмента  $\gamma$ -гидрокси-алкеннитрила или дигидроксинитрила в пятичленном А цикле тритерпеноида реализована в условиях основного катализа ( $\text{KOH}/\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ).

5. Разработаны методы синтеза и селективной внутримолекулярной нитрил-анионной циклизации 2,3-секо-18 $\alpha$ H-олеанановых этилкетона и его  $\alpha$ -бромзамещенного производного. Экспериментально показано, что С(1)–С(3) циклизация этилкетона протекает по оксонитрильному пути с образованием фрагмента 3-этилзамещенного  $\alpha,\beta$ -алкеннитрила в пятичленном цикле А, тогда как его бромпроизводное подвергается нитрил-анионной С(1)–С(3) циклизации с отщеплением циано-группы и образованием фрагмента 2-метилзамещенного алкенкетона в шестичленном цикле А.

6. В результате скрининга противовирусных свойств продуктов синтеза выявлен 3-метил-1-циано-19 $\beta$ ,28-эпокси-2,3-секо-2-нор-18 $\alpha$ H-олеан-3-он с ингибирующим эффектом в отношении ВГП-1 и ВИЧ-1 ( $\text{EC}_{50}$  45,1 и 15,4 мкМ соответственно). По данным скрининга цитотоксической активности, отобран метиловый эфир 3-бромметил-3-оксо-1-циано-2,3-секо-2-норлуп-20(29)-ен-30-аль-28-овой кислоты, цитотоксичный ( $\text{IC}_{50}$  0,8–25,4 мкМ) в отношении опухолевых клеток и их клонов с множественной лекарственной устойчивостью, проапоптотический механизм действия которого реализуется активацией каспаз 8, 3/7.



**Перспективы дальнейшей разработки темы диссертационного исследования.** Предложенные в диссертационной работе подходы к синтезу и внутримолекулярной циклизации 3-алкилзамещенных 1-циано-2,3-секотритерпеноидов могут быть успешно применены на других объектах с целью расширения библиотеки биологически активных тритерпеноидов. При этом установленные закономерности в проявлении противоопухолевой и противовирусной активности полученных соединений позволяют прогнозировать свойства целевых тритерпеноидов. Впервые описанный бромметилкетон лупанового типа перспективен в качестве противоопухолевого агента и требует дополнительных биологических исследований.

**Основное содержание диссертации опубликовано в следующих работах:**

*Статьи в рецензируемых научных журналах, определенных ВАК РФ и  
Аттестационным советом УрФУ*

1. **Pereslavl'tseva (Konysheva) A.V.**, Tolmacheva I.A., Slepukhin P.A., El'tsov O.S., Kucherov I.I., Eremin V.F., Grishko V.V. Synthesis of A-pentacyclic  $\alpha,\beta$ -alkenenitriles // Chem. Nat. Compd. – 2014. – V. 49. – N. 6. – P. 1059-1066 (0.44 п.л. / 0.08 п.л.) (Scopus, WoS).
2. Grishko V.V., Tolmacheva I.A., **Pereslavl'tseva (Konysheva) A.V.** Triterpenoids with a five-membered A-ring distribution in nature, transformations, synthesis and biological activity // Chem. Nat. Compd. – 2015. – V. 51. – N. 1. – P. 1193 (1.25 п.л. / 0.42 п.л.) (Scopus, WoS).
3. **Konysheva A.V.**, Tolmacheva I.A., Eroshenko D.V., Grishko V.V. Synthesis of betulin derivatives with an  $\alpha,\beta$ -alkenenitrile in a five-membered ring A // Chem. Nat. Compd. – 2017. – V. 53. – N. 3. – P. 497-500 (0.19 п.л. / 0.08 п.л.) (Scopus, WoS).
4. **Konysheva A.V.**, Tolmacheva I.A., Savinova O.V., Boreko E.I., Grishko V.V. Regioselective transformation of the cyano group of triterpene  $\alpha,\beta$ -alkenenitriles // Chem. Nat. Compd. – 2017. – V. 53. – N. 4. – P. 687-690 (0.19 п.л. / 0.06 п.л.) (Scopus, WoS).
5. **Konysheva A.V.**, Nebogatikov V.O., Tolmacheva I.A., Dmitriev M.V., Grishko V.V. Synthesis of cytotoxically active derivatives based on alkylated 2,3-seco-triterpenoids // Eur. J. Med. Chem. – 2017. – V. 140. – P. 74-83 (0.56 п.л. / 0.20 п.л.) (Scopus, WoS).
6. **Konysheva A.V.**, Zhukova A.E., Dmitriev M.V., Grishko V.V. Synthesis and intramolecular cyclization of a 2,3-seco-oleanane triterpenoid with an ethylketone fragment // Chem. Nat. Compd. – 2018. – V. 54. – N. 6. – P. 1094-1099 (0.31 п.л. / 0.11 п.л.) (Scopus, WoS).
7. Eroshenko D.V., Krainova G.F., **Konysheva A.V.**, Dmitriev M.V., Grishko V.V. Synthesis, modification, and cytotoxic evaluation of 2,3-secotriterpenic  $\beta$ -ketoesters // Bioorg. Med. Chem. Lett. – 2018. – V. 28. – N. 23-24. – P. 3752-3760 (0.50 п.л. / 0.15 п.л.) (Scopus, WoS).
8. **Konysheva A.V.**, Eroshenko D.V., Grishko V.V. Synthesis, cyclization, and cytotoxic activity of 2,3-secolupane triterpenoids with ethylketone fragment // Nat. Prod. Commun. – 2019. – V. 14. – N. 10. – P. 1934578X19878919 (0.44 п.л. / 0.19 п.л.) (Scopus, WoS).
9. **Конышева А.В.**, Крайнова Г.Ф., Ерошенко Д.В., Дмитриев М.В., Гришко В.В. Превращения А-секо-18 $\alpha$ H-олеанановых гидроксинитрилов // Изв. АН. Сер. хим. – 2019 – №. 12. – С. 2252-2261 (0.56 п.л. / 0.17 п.л.) (Scopus, WoS).
10. **Konysheva A.V.**, Grishko V.V. SAR analysis and bioactive potential of C(3) alkylated triterpenoids // AIP Conference Proceedings. – AIP Publishing LLC. – 2020. – V. 2280. – N. 1. – P. 0018484 (0.25 п.л. / 0.13 п.л.) (Scopus).
11. Rybalkina E.Y., Moiseeva N.I., Karamysheva A.F., Eroshenko D.V., **Konysheva A.V.**, Nazarov A.V., Grishko V.V. Triterpenoids with modified A-ring as modulators of P-gp-dependent drug-resistance in cancer cells // Chem. Biol. Interact. – 2021. – V. 348. – P. 109645 (0.69 п.л. / 0.10 п.л.) (Scopus, WoS).

*Монографии*

12. Tolmacheva I.A., Galaiko N.V., Igosheva E.V., **Konysheva A.V.**, Nazarov A.V., Krainova G.F., Gorbunova M.N., Boreko E.I., Eremin V.F., Grishko V.V. Synthesis and transformations of 2,3-secotriterpene derivatives of betulin // In: Chemistry and Technology of Plant Substances. – Waretown (USA): Apple Academic Press. – 2017. – P. 3-25. 395 p (1.38 п.л. / 0.14 п.л.) (Scopus).

*Патенты на изобретение*

13. Толмачева И.А., Гришко В.В., **Переславцева (Коньшева) А.В.**, Бореко Е.И., Еремин В.Ф., Савинова О.В., Кучеров И.И. А-Секотритерпеноиды с фрагментом метилкетона // Патент РФ № 2537840 от 10.01.2015. Бюл. № 1 (0.50 п.л. / 0.07 п.л.).

14. **Коньшева А.В.**, Небогатиков В.О., Толмачева И.А., Гришко В.В., Рыбалкина Е.Ю., Карамышева А.Ф. Метилловые эфиры 3-метил-3-оксо-1-циано-2,3-секо-2-норлуп-20(29)-ен-30-аль-28-овой и 3-бромметил-3-оксо-1-циано-2,3-секо-2-норлуп-20(29)-ен-30-аль-28-овой кислот, проявляющие цитотоксическую активность // Патент РФ № 2632002 от 2.10.2017. Бюл. № 28 (0.50 п.л. / 0.08 п.л.).

*Публикации в других журналах и сборниках*

15. **Переславцева (Коньшева) А.В.**, Галайко Н.В. Бетулин как перспективный источник для получения противовирусных препаратов // Вестник Пермского научного центра. – 2013. – № 3. – С. 34-41 (0.44 п.л. / 0.22 п.л.) (РИНЦ).

16. **Переславцева (Коньшева) А.В.**, Кораблев И.С., Толмачева И.А., Гришко В.В. Полусинтетические тритерпеноиды с фрагментом ен-нитрила в А-пентацикле // Тезисы докладов IX Всероссийской конференции «Химия и медицина» с Молодежной научной школой по органической химии. – Уфа. – 2013. – С. 254 (0.06 п.л. / 0.02 п.л.).

17. **Pereslavceva (Konysheva) A.V.**, Tolmacheva I.A., Eremin V.F., Boreko E.I., Grishko V.V. The Grignard reaction in synthesis of 18 $\alpha$ H-oleanane A-seco- and A-pentacyclo-derivatives // Abstracts of X International Symposium on the chemistry of natural compounds. – Bukhara. – Uzbekistan. – 2013. – P. 272 (0.06 п.л./0.01 п.л.).

18. **Переславцева (Коньшева) А.В.**, Толмачева И.А., Гришко В.В. Синтез, циклизация и функционализация А-секотритерпеновых метилкетонов // Сборник тезисов Уральского научного форума «Современные проблемы органической химии». XVII Молодежной школы-конференции по органической химии. – Екатеринбург. – 2014. – С. 52 (0.06 п.л./0.02 п.л.).

19. **Коньшева А.В.**, Толмачева И.А., Дубова Д.Д., Гришко В.В. Синтез 1-циано-2,3-секопроизводных бетулина // Тезисы докладов кластера конференций по органической химии «ОргХим-2016». – Санкт-Петербург (пос. Репино). – 2016. – С. 587 (0.06 п.л. / 0.02 п.л.).

20. **Коньшева А.В.**, Толмачева И.А., Гришко В.В. Синтез и модификация 1-циано-2,3-секотритерпеноидов с фрагментом метилкетона // Сборник тезисов докладов V Международной конференции «Техническая химия. От теории к практике». – Пермь. – 2016. – С. 94 (0.06 п.л. / 0.02 п.л.).

21. **Коньшева А.В.**, Небогатиков В.О., Толмачева И.А., Гришко В.В. Алкилированные А-секотритерпеноиды в синтезе биологически активных агентов // Тезисы докладов X Всероссийской научной конференции и школы молодых ученых «Химия и технология растительных веществ». – Казань. – 2017. – С. 53-54 (0.12 п.л. / 0.04 п.л.).

22. **Konysheva A.V.**, Tolmacheva I.A., Grishko V.V. Selective transformations of cyano group of triterpene  $\alpha,\beta$ -alkene-nitriles // Abstracts of XII International symposium on the chemistry of the natural compounds. – Tashkent. – 2017. – P. 374 (0.06 п.л. / 0.02 п.л.).

23. **Коньшева А.В.**, Небогатиков В.О., Толмачева И.А., Гришко В.В. Синтез и биологические свойства 3-метилзамещенных 2,3-секотритерпеноидов и их производных //

Сборник тезисов докладов V Всероссийской конференции с международным участием «Енамины в органическом синтезе». – Пермь. – 2017. – С. 51 (0.06 п.л. / 0.02 п.л.).

24. **Конышева А.В.**, Жукова А.Е., Гришко В.В. Синтез и цитотоксический скрининг 3-этилзамещенных 18 $\alpha$ H-олеанановых тритерпеноидов // Материалы II Международной научной конференции «Высокие технологии, определяющие качество жизни» – Пермь. – 2018. – С. 226-228 (0.19 п.л. / 0.09 п.л.).

25. **Конышева А.В.**, Ерошенко Д.В., Гришко В.В. Лупановые производные бетулина как перспективные противоопухолевые агенты // Материалы XI Всероссийского конгресса молодых ученых-биологов с международным участием «Симбиоз-Россия 2019» – Пермь. 2019. – С. 259-260 (0.12 п.л. / 0.05 п.л.).

Подписано в печать      Формат 60×90/16.  
Бумага офсетная      Печать офсетная  
Заказ                      Тираж XXX экз.

---

Отпечатано в XXXXXX