

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Пухова Сергея Александровича «Новые антинеопласты на основе сесквитерпеновых лактонов девясила высокого», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – «Биоорганическая химия»

Диссертационная работа Пухова Сергея Александровича «Новые антинеопласты на основе сесквитерпеновых лактонов девясила высокого» посвящена развитию важного междисциплинарного научного направления – созданию новых лекарственных препаратов на основе модифицированных вторичных метаболитов растений. Синтез новых производных на основе сесквитерпеновых α -метилена- γ -лактонов растения девясила высокий и оценка их биологической активности с целью получения лекарственных препаратов нового поколения, предназначенных для терапии таких тяжелых заболеваний, как злокачественные новообразования, несомненно, является актуальной задачей.

Диссертация С.А. Пухова представляет собой комплексное исследование биологической активности природных сесквитерпеновых α -метилена- γ -лактонов растения девясила высокий, относящихся к эвдесмановому структурному типу, а также производных, полученных на их основе. В задачи работы входило выделение в препаративных количествах из растительного сырья целевых лактонов, модифицирование каркаса природных лактонов с сохранением активированной экзометиленовой группы, синтез аминопроизводных природных лактонов аза-реакцией Михаэля и оценка биологической активности полученных соединений в отношении опухолевых клеточных линий с целью выявления соединений-лидеров и предположительного механизма их действия.

В качестве основы для создания новых молекул автором выбраны сесквитерпеновые лактоны алантолактон и изоалантолактон, на их основе получены структурные аналоги, введением которых в аза-реакцию Михаэля с участием фармакоформных аминов получены 46 новых соединения с потенциальной противоопухолевой активностью.

Диссертационная работа С.А. Пухова состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, обсуждения собственных результатов, экспериментальной части, заключения и списка используемых источников.

Обзор литературы представляет собой подробное описание эвдесманолидов растений рода *Inula*. Приведены структурные формулы лактонов, свойства наиболее распространенных представителей этого класса алантолактона и изоалантолактона, данные по химической модификации и биологической активности эвдесманолидов и кратко рассмотрены механизмы противоопухолевого действия природных лактонов. Обзор

отражает высокую квалификацию автора и владение им современной информацией по теме исследования.

В разделе 2 четко описаны объекты исследования и биологические методы. Автором использованы современные методы клеточных технологий: определение жизнеспособности клеток МТТ-тестом и тестом с ресазурином, определение интенсивности перекисного окисления липидов и восстановительной активности, исследование участия сигнального пути р53 в гибели опухолевых клеток, исследование гибели опухолевых клеток методом проточной цитометрии. Изучение антипролиферативной активности проводилось на четырех опухолевых линиях клеток, в том числе с использованием генно-модифицированной линии.

Достоверность экспериментальных данных обеспечивается использованием современных средств и методик проведения исследований и подтверждается статистической обработкой данных с использованием современных компьютерных программ.

В разделе 3 изложены основные результаты, полученные автором и непосредственно демонстрирующие научную новизну работы. С.А. Пуховым синтезированы аналоги природных алантолактона и изоалантолактона, отличающиеся заместителями в декалиновом фрагменте. Получены соединения, в структуре которых сохраняется активированная двойная связь лактонного цикла, химическим путем получен аллоалантолактон, являющийся минорным компонентом растений рода *Inula*, а также эпоксиды аланто-, изоаланто- и аллоалантолактонов. Реакции лактонов с фармакофорными аминами по типу аза-реакции Михаэля привели к образованию ряда гибридных молекул, содержащих два биологически активных фрагмента – сесквитерпенового лактона и биологически активного амина. Исследована стереохимия аза-реакции Михаэля и доказано образование единственного стереоизомера с *R*-конфигурацией нового хирального центра. Автором обнаружена не описанная ранее гетероциклическая система, образующаяся при взаимодействии эпоксиалантолактона с первичными аминами при раскрытии эпокси группы и замыкании пирролидинового цикла. В результате химических экспериментов диссертантом получен большой ряд лактонов и их конъюгатов, предназначенных для дальнейшего изучения противоопухолевой активности.

Антипролиферативная активность исследована непосредственно автором на широко распространенных в биологическом скрининге культурах опухолевых клеток, моделирующих злокачественные заболевания молочной железы, кишечника, кожи и крови. Для оценки противоопухолевого потенциала автор использовал репрезентативные тесты с прижизненными красителями МТТ и ресазурином. Выявлены соединения-лидеры для разработки на их основе новых эффективных антинеопластов.

Для изучения вероятных механизмов действия наиболее активных соединений определена интенсивность перекисного окисления липидов и восстановительная активность, проведено выяснение вклада окислительного стресса, вызываемого действием соединений, в механизм гибели опухолевых клеток, в том числе с предобработкой клеток *N*-ацетилцистеином. Установлено, что роль активных форм кислорода не имеет первостепенного значения для реализации механизма действия активных соединений. Методом проточной цитометрии определено, что гибель клеток миелоидного лейкоза под действием эпоксиалантолактона и ряда его производных происходит путем апоптоза. Исследование участия сигнального пути p53 в апоптотической гибели опухолевых клеток осуществлено с использованием дефицитной по белку p53 линии клеток HCT116 в сравнении с линией HCT116, экспрессирующей данный белок. Оказалось, что ряд соединений действовал в обход сигнальных путей белка p53, что позволяет с оптимизмом рассматривать перспективы создания высокоэффективных противоопухолевых препаратов на основе таких модифицированных лактонов.

В целом полученные автором результаты являются новыми, экспериментальная часть значительна по объему, достоверность экспериментальных результатов не вызывает сомнений. Выводы лаконичны, хорошо обоснованы и соответствуют полученным данным. Основные результаты диссертации опубликованы в 5 научных статьях, а также апробированы на 7 различных конференциях и симпозиумах. Указанные публикации, как и автореферат, достаточно полно отражают содержание диссертационной работы.

При ознакомлении с диссертацией возникли некоторые вопросы и замечания.

1. Из литературного обзора и обсуждения результатов остается не вполне ясным выбор аминов сложной структуры в качестве фармакофорных компонентов для синтеза гибридных молекул. Обсуждение причин изменения противоопухолевых свойств соединений при введении аминокпроизводных усилило бы аргументацию при постановке задач диссертационной работы.

2. Диссертантом получен ряд лактонов и их производных (всего 53 соединения, стр. 11 автореферата). Однако в диссертации представлено изучение биологического действия для различных выборок из этого массива соединений. Так, например, для изучения жизнеспособности клеток опухолевых клеток линий аденокарциномы молочной железы линии MCF17, меланомы кожи линии MS и аденокарциномы толстого кишечника линии HCT116 применялось более 50 соединений, а для клеток миелоидного лейкоза линии K562 этот параметр изучался с использованием только 11 соединений. При этом ряд тестов, таких как определение интенсивности перекисного окисления липидов, изучение антиоксидантной активности, выяснение вклада окислительного стресса и исследование

участия сигнального пути белка p53 в гибели опухолевых клеток, проводились только на примере эпоксиалантолактона L5 его производных. Основания выбора соединений для проведения тех или иных тестов из диссертации неясны и требуют дополнительных комментариев.

3. В работе используется термин «antineoplastы» (от англ. «antineoplastic»), широко применяемый в англоязычной литературе, но на данный момент практически отсутствующий в публикациях на русском языке. Во избежание неоднозначной интерпретации было бы полезно дать комментарии, какие признаки позволяют отнести то или иное соединение в antineoplastам.

Однако данные замечания не снижают достоинств работы в целом и не отражаются на ее общей высокой оценке.

По актуальности поставленных задач, новизне полученных результатов и достоверности сделанных выводов диссертационная работа Пухова Сергея Александровича как научно-квалификационная работа полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор Пухов Сергей Александрович, несомненно, заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – «Биоорганическая химия».

кандидат химических наук
старший научный сотрудник лаборатории иммунобиохимии
Института биохимии им. А.Н. Баха ФИЦ Биотехнологии РАН

Гендриксон Ольга Дмитриевна

«25» ноября 2016 г.

Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» (ФИЦ Биотехнологии РАН), Институт биохимии им. А.Н. Баха, лаборатория иммунобиохимии.
Почтовый адрес: Ленинский проспект, д. 33, стр. 2, 119991 Москва, Россия
Телефон: (495)954-28-04. Адрес электронной почты: odgendrik@gmail.com



Подпись руки О.Д. Гендриксон заверяю:

Ученый секретарь ФИЦ Биотехнологии РАН,
канд. биол. наук

А.Ф. Орловский

«25» ноября 2016 г.