



Федеральное агентство научных организаций (ФАНО России)
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова
Дальневосточного отделения Российской академии наук
(ТИБОХ ДВО РАН)

690022, г. Владивосток, проспект 100 лет Владивостоку, 159.
Тел.: (423) 231-14-30, Факс.: (423) 231-40-50, эл. почта: office@piboc.dvo.ru, www.piboc.dvo.ru
ОКПО 02698170, ОГРН 1022502129540, ИНН2539001223, КПП 253901001

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
Тихоокеанского института биоорганической
химии им. Г.Б. Елякова Дальневосточного
отделения Российской академии наук
академик В.А. Стоник

«07» _декабря 2016 г.



О Т З Ы В

ведущей организации о диссертационной работе
**Пухова Сергея Александровича «Новые антинеопласты на основе
сесквитерпеновых лактонов девясила высокого»,**
представленной на соискание ученой степени кандидата химических наук
по специальности 02.00.10 - биоорганическая химия

В последние годы медицинские химики все чаще обращаются к природным соединениям для поиска новых противоопухолевых препаратов. Причем большой интерес представляет не только выделение биологически активных веществ из природных источников, но и разработка методов их химической модификации, которая обычно приводит к получению соединений с улучшенными фармакологическими характеристиками, их водорастворимых и транспортных форм. Важное значение имеют также установление механизмов биологического действия природных и модифицированных соединений и выявление взаимосвязи между структурой и активностью.

Одним из объектов таких исследований являются сесквитерпеновые лактоны – вторичные метаболиты растений семейства сложноцветных,

которые отличаются большим разнообразием структур. Интерес к сесквитерпеновым лактонам вызван их высокой и разнообразной физиологической активностью. Однако к настоящему времени механизм их противоопухолевого действия на клеточном и субклеточном уровнях исследован недостаточно подробно. В связи с этим тематика диссертационной работы С.А. Пухова, а именно: изучение действия сесквитерпеновых лактонов эвдесманового структурного типа, компонентов растения девясила высокий (*Inula helenium*), и их полусинтетических аналогов на опухолевые клетки человека, является довольно актуальной.

Диссертационная работа изложена на 138 страницах, содержит 83 рисунка (структурные формулы соединений, схемы реакций, графики) и 15 таблиц. Она включает следующие разделы: введение, литературный обзор, объекты и методы исследования, результаты и их обсуждение, заключение, список используемых источников (179 литературных ссылок).

Во Введении отмечены актуальность темы диссертации и степень ее разработанности, цели и задачи работы, а также оценены научная новизна, теоретическая и практическая значимость. Представлены методы и методология исследования и перечислены положения, выносимые на защиту. Подчеркнута степень достоверности полученных результатов и места их апробации.

Литературный обзор, посвященный эвдесманоидам растений рода *Inula* и их биологической активности, систематизирует и анализирует данные 160 опубликованных оригинальных работ по этой тематике. В нем представлены сведения как классических исследований, так и статей, опубликованных в последнее десятилетие. Приведенные формулы лактонов эвдесманового ряда, выделенных из разных видов девясила, их химические превращения и данные о биологической активности свидетельствуют о большом интересе к соединениям этого класса. В конце обзора кратко перечислены молекулярные мишени действия сесквитерпеновых лактонов.

Во втором разделе представлены объекты и биологические методы исследования, в том числе общие методики определения жизнеспособности клеточных линий. С.А. Пухов рассматривает наиболее эффективные способы химической модификации природных α -метил- γ -лактонов и выбор биологических объектов для изучения влияния их действия – панель клеточных опухолевых линий различной этиологии.

В разделе «Результаты и обсуждение» приведены наиболее существенные экспериментальные результаты, полученные непосредственно диссертантом. Раздел состоит из 2 частей – химической («Модифицирование природных лактонов») и биологической. В химической части описано выделение природных алантолактонов и их реакции по декалиновому и лактонному фрагментам, в результате которых получен большой ряд не описанных ранее соединений, содержащих в своей структуре фрагменты сесквитерпенового лактона и фармакофорного амина. Следует отметить тщательное исследование стереохимии образующихся продуктов, в том числе с применением современного арсенала физико-химических методов – двумерной спектроскопии ЯМР и рентгеноструктурного анализа. Особый интерес представляет обнаруженная автором рециклизация аминокислотных производных эпоксиалантолактона с образованием новой гетероциклической системы - N-замещенных гидрированных бензофууроиндолонов.

В биологической части проанализированы экспериментальные данные, полученные при тестировании соединений *in vitro*: определена жизнеспособность опухолевых клеток нескольких линий (MCF7, MS, HCT116, K562) под воздействием исследуемых соединений, показано их влияние на интенсивность перекисного окисления липидов, оценена восстановительная активность природных лактонов и их производных. Следует отметить подраздел, посвященный исследованию участия сигнального пути p53 в гибели опухолевых клеток. С этой целью диссертантом использованы клеточная линия аденокарциномы толстого

кишечника человека НСТ116 wt p53, экспрессирующая белок p53, и ее вариант с нокаутом этого белка (НСТ116 p53^{-/-}). Оказалось, что некоторые конъюгаты одинаково цитотоксичны как в отношении клеток «дикого» типа, так и нокаутных клеток. Для выяснения вклада окислительного стресса, вызываемого действием соединений, в механизм гибели опухолевых клеток была осуществлена предобработка клеток *N*-ацетилцистеином. Установлено, что в таких условиях ряд конъюгатов сохраняет свою токсичность. Для установления механизмов биологического действия полученных соединений проведено дополнительное исследование гибели опухолевых клеток методом проточной цитометрии. В конце раздела обсуждены вероятные механизмы действия природных лактонов и их производных.

В экспериментальной части (раздел IV) представлены экспериментальные методики и физико-химические характеристики (в том числе результаты рентгенографических исследований) всех полученных соединений.

Таким образом, в диссертационной работе С.А. Пухова была синтезирована серия производных сесквитерпеновых лактонов и изучена их противоопухолевая активность. Полученные результаты важны для разработки лекарственных препаратов с противоопухолевым действием на основе этих соединений.

Следует отметить, что все представленные в работе результаты получены непосредственно диссертантом, в некоторых случаях с его участием. Изложенные в работе методы сопровождаются наглядными схемами реакций (в большинстве с предположительными механизмами) и результатами испытаний *in vitro* в виде показателей IC₅₀. Автор делает закономерный вывод о результатах выполненного исследования: как исходные природные сесквитерпеновые лактоны, так и их производные обладают высокой антипролиферативной активностью, при этом показывают избирательность действия на клеточные опухолевые линии. Диссертант

выделяет наиболее эффективные соединения с точки зрения противоопухолевого действия.

Данные, представленные в разделах 2, 3 и 4 диссертационной работы, отражают степень достоверности результатов проведенных экспериментов. Научную новизну диссертационного исследования С.А.Пухова подтверждают следующие положения:

1. На основе природных алантолактонов и биологически активных аминов синтезированы новые гибридные молекулы, сочетающие в своей структуре фармакофорные фрагменты разного структурного типа.

2. Получена новая гетероциклическая система – гидрированные бензофууроиндолонны, а также предложен механизм их образования.

3. Для известных природных соединений и синтезированных на их основе конъюгатов впервые определены показатели IC_{50} в отношении ряда опухолевых клеточных линий.

4. В результате комплексного анализа данных о биологической активности протестированных соединений выявлены соединения-лидеры, рекомендованные для доклинических исследований.

Научная значимость результатов работы заключается в том, что теоретические выводы позволяют дополнить известные данные о взаимосвязи «структура – активность» по отношению к биологическим мишеням действия сесквитерпеновых лактонов и их новых производных. Практическое значение диссертации состоит в синтезе большого ряда производных лактонов и исследовании их биологической активности, в результате которой выявлен ряд соединений, рекомендованных для проведения доклинических испытаний в качестве эффективных антинеопластов.

Выбранная диссертантом тема полностью соответствует специальности 02.00.10 – биоорганическая химия и представляет интерес для специалистов не только в области химии природных соединений, но и медицинской химии и биохимии, а также смежных научных направлений. С полученными в ходе

диссертационного исследования данными целесообразно ознакомить следующие организации: Химический факультет Московского государственного университета им. М.В.Ломоносова, Российский онкологический научный центр им. Н.Н.Блохина РАМН, Институт биохимической физики им. Н.М.Эмануэля РАН, Институт биоорганической химии им. акад. М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН и другие научные учреждения.

Существенных замечаний по работе нет. В качестве пожеланий можно отметить следующее:

Стр.54, пункт 2.2.9. Следует писать, что «...В тестовые пробирки, содержащие 1×10^5 клеток/100 мкл, добавили 5 мкл препарата Annexin V, конъюгированного с флуорохромом Alexa Fluor 488...»

Стр.86-89, рис.3.24 - 3.26. В левой верхней дотограмме рисунков следует указать «гейты» выделения облака клеток, взятых для последующего анализа.

В Автореферате на стр. 12, Табл. 7 следует в примечании пояснить значение квадрантов цитограммы, соответствующих определенной популяции клеток: «D» - поврежденные, «N» - некротические, «V» - жизнеспособные, «A» - апоптотические.

Замечания носят рекомендательный характер и могут быть учтены соискателем в дальнейших публикациях по теме исследования.

Автореферат представляет основные этапы и результаты работы, включает необходимые структурные элементы и полностью отражает содержание диссертации. По теме диссертационного исследования опубликовано 5 статей в научных журналах, рекомендованных ВАК, и 7 тезисов докладов в сборниках трудов конференций различного уровня, которые также соответствуют содержанию диссертации.

Диссертационная работа носит законченный характер. Она написана грамотным литературным языком, стиль изложения доказательный. Выводы конкретны, правильно сформулированы и хорошо аргументированы, имеют

теоретическое обоснование и полностью отражают полученные экспериментальные результаты.

Таким образом, диссертация С.А. Пухова ««Новые антинеопласты на основе сесквитерпеновых лактонов девясила высокого» по актуальности, научной новизне и практической значимости полностью соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям. Согласно пункту 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» (Постановление Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г.), она является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение новой практически важной задачи, имеющей существенное значение для развития биоорганической химии и смежных областей науки, а её автор, Пухов Сергей Александрович, заслуживает присуждения ему степени кандидата химических наук.

Диссертационная работа С.А.Пухова была обсуждена на семинаре лаборатории биоиспытаний и механизма действия биологически активных веществ ТИБОХ ДВО РАН, дата 07.12.2016, протокол № 4/16.

Отзыв составил Аминин Дмитрий Львович, к.б.н., ст.н.сотр, зав.лабораторией биоиспытаний и механизма действия биологически активных веществ ТИБОХ ДВО РАН, г. Владивосток 690022, проспект 100 лет Владивостоку, 159, тел. 7(423)231-99-32, e-mail: daminin@piboc.dvo.ru

 /Аминин Д. Л./

Дата: 07 декабря 2016 г.