

ОТЗЫВ

**официального оппонента на диссертационную работу Дышлогого Сергея
Анатольевича «Противоопухолевое действие некоторых низкомолекулярных
соединений из морских беспозвоночных», представленную на соискание ученой
степени доктора биологических наук
по специальности 03.01.04-«Биохимия»**

Актуальность темы исследования. Анализ работ в области лечения человека показывает, что одной из основных задач современной науки является борьба с онкологическими заболеваниями. К сожалению, существующие способы лечения большинства типов онкопатологий малоэффективны. Поэтому разработка и исследование новых противоопухолевых препаратов по-прежнему является актуальной научной проблемой. Одним из общепризнанных источников таких препаратов являются химические соединения, полученные из морских организмов, в частности из морских беспозвоночных. Эта многочисленная группа морских организмов – богатый источник низкомолекулярных соединений с уникальной структурой, продуцируемых как самими животными, так и их симбионтами. Вторичные метаболиты этих морских организмов обладают различной биологической активностью, в частности, противоопухолевой, что подтверждено клиническими испытаниями. Как правило, исследование биологически активных соединений приводит к открытию их новых свойств, которые позволяют использовать эти соединения в качестве молекулярных инструментов для биохимических работ. Эффективность и актуальность идеи поиска новых активных молекул среди низкомолекулярных метаболитов морских беспозвоночных подтверждена значительным числом ежегодных публикаций в ведущих международных научных журналах.

Обобщая вышеизложенное, можно сказать, что постановка **цели настоящей работы**, как изучение молекулярных механизмов действия ряда морских природных соединений, проявляющих цитотоксические свойства в отношении опухолевых клеток, а также изучение их противоопухолевого действия, была правомерной и позволила внести фундаментальный вклад в современную биохимию.

Наиболее существенные научные результаты, отвечающие критериям новизны.

В результате изучения большой серии природных соединений и их производных из морских беспозвоночных найдены вторичные метаболиты, проявляющие цитотоксическое действие на опухолевые клетки, в частности, гуанидиновые алкалоиды из морских губок,

тритерпеновые и стероидные метаболиты из различных беспозвоночных, некоторые гликозиды, в том числе фрондозид А из голотурии *Cucumaria okhotensis*, ризохалин и его агликон, микаламид А из асцидии *Polysincraton* sp. и другие. Показано, что некоторые из этих веществ (микаламид А, монанхоцидин В, урупоцидин А и др.) в нецитотоксических концентрациях тормозят образование микроколоний опухолевых клеток при действии на эти клетки эпидермального фактора роста EGF.

Впервые найдены морские природные соединения, индуцирующие цитотоксическую аутофагию (монанхоцидин А) или ингибирующие цитопротекторную аутофагию опухолевых клеток (ризохалинин и фрондозид А), изучены особенности молекулярных механизмов действия этих соединений.

Впервые установлены особенности действия тестируемых веществ на внутриклеточные процессы, в частности их влияние на митоген-активируемые киназы (МАРК), ядерные факторы, фактор индукции апоптоза (AIF), активность и расщепление каспаз, ионные каналы и др. Охарактеризован необычный неапоптотический механизм цитотоксического действия алкалоида монанхоцидина А, а также его способность преодолевать лекарственную устойчивость и ингибировать миграцию опухолевых клеток.

Впервые выявлены аспекты молекулярных механизмов цитотоксического действия гуанидиновых алкалоидов: монанхоцидина В, монанхомикалина С, птиломикалина А, пульхранина А, урупоцидина А, монанхомикалина В и нормонанхоцидина D. Установлено, что тритерпеновый гликозид фрондозид А, кроме ингибирования цитопротекторной аутофагии опухолевых клеток, индуцирует их р53-независимый апоптоз и вызывает транслокацию AIF из митохондрий в ядро, предварительно стимулируя переход AIF в свою апоптогенную форму.

Испытания противоопухолевого действия фрондозид А и ризохалинина *in vivo* на мышах с привитыми опухолями рака простаты человека показали, что эти вещества тормозят рост опухолей и могут считаться новыми лидерными соединениями для разработки на их основе противоопухолевых лекарств.

Таким образом, для исследуемых соединений открыты новые молекулярные механизмы, а также показана противоопухолевая эффективность *in vitro* и *in vivo*. Результаты, полученные С.А. Дышловым, имеют не только большую теоретическую значимость и расширяют фундаментальные знания о молекулярных механизмах действия противоопухолевых соединений, но и интересны с **практической** точки зрения. Установлена зависимость противоопухолевой активности ряда синтезированных производных ризохалинина от структуры этих веществ и определены направления дальнейшей химической модификации данного класса соединений с целью оптимизации их

противоопухолевых свойств. Данная работа создаёт научную основу для развития проектов, направленных на практическое использование в онкологии новых природных соединений, выделенных из морских беспозвоночных, а также применение этих соединений в качестве реагентов для клеточной биологии и биохимии.

Личный вклад автора. Согласно опубликованным работам, подавляющее количество представленных в работе экспериментальных данных было получено С.А. Дышловым лично. Часть исследуемых соединений была получена самим соискателем, часть – предоставлена его коллегами, что чётко указано в диссертационной работе.

Достоверность результатов и выводов. Полученные результаты хорошо проиллюстрированы, данные представлены в виде графиков, таблиц и микрофотографий. Достоверность данных не вызывает сомнений, их статистический анализ проведён корректно. Все выводы обоснованы и подкреплены экспериментальными данными.

Апробация работы. Полученные соискателем результаты были представлены на 7 международных конференциях, конгрессах и симпозиумах. Всего соискателем было опубликовано 76 работ, из которых непосредственно по теме диссертации – 33, включая 28 научных статей, опубликованных в изданиях из списка ВАК, 5 материалов конференций.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, литературного обзора, обсуждения результатов, экспериментальной части, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Список цитируемой литературы включает 341 цитируемую работу. Диссертация изложена на 277 страницах, содержит 114 рисунков и 12 таблиц. Автореферат соответствует содержанию диссертации.

В разделе «Введение» излагается суть проблемы и объясняется актуальность проведённого исследования. В разделе «Литературный обзор» приводятся основные имеющиеся на настоящий момент знания из затронутых в диссертации отраслях науки, а также даётся информация, необходимая для понимания работы неспециалистом в данной области. В разделе «Обсуждение результатов» приводятся экспериментальные данные и даётся их интерпретация. Раздел хорошо проиллюстрирован. В главе «Экспериментальная часть» описываются методики проведения основных экспериментов, приводятся необходимые ссылки на стандартные процедуры. В «Заключении» кратко рассматриваются полученные данные и обсуждаются перспективы дальнейшего продолжения и применения данной работы. В разделе «Выводы» приводятся пять главных обобщений диссертационной работы. Все выводы основаны на экспериментальных данных, приведённых в главе «Обсуждение результатов».

Впечатляет объем проделанной экспериментальной работы, разнообразие и уместность примененных методов анализа. Интерпретация результатов максимально

облегчена и расшифрована для читателя, не искушённого в деталях последних достижений в данной области. Хорошо прослеживается логика исследования, которая приводит к однозначным выводам. Отчетливы видны перспективы и план дальнейших исследований автора в выбранном направлении.

Несмотря на несомненную научную значимость и последовательный стиль изложения работы, возникли следующие **замечания и вопросы**:

Стр. 10. Перечисленные здесь «специфические условия обитания» прежде всего характеризуют условия обитания холодноводных и глубоководных морских организмов, а не специфику условий обитания морских организмов по сравнению с наземными. Кроме того, отличия в структуре вторичных метаболитов между морскими и наземными организмами, скорее всего, обусловлены метаболизмом, который специфичен для уникальных таксонов водных обитателей, не встречающиеся на суше.

Стр. 11. Следует учитывать, что «беспозвоночные» не являются таксономической группой, однако объединяют около 90% всех видов морских животных и, соответственно, чаще, чем другие организмы, становятся объектом для выделения биологически активных веществ в силу своей многочисленности.

Стр. 45. Следует дать более чёткое определение аутофагии.

Стр. 51. Большая часть раздела «Обсуждение результатов» содержит описание самих результатов, поэтому уместно традиционное название: «Результаты и обсуждение».

Стр. 61. Поскольку в тексте не определён ни вид микроорганизма, который предположительно продуцирует микаламид А, ни характер его взаимоотношений с животными, вряд ли следует говорить о симбиозе. Более уместно упомянуть об ассоциированных микроорганизмах.

Автор не приводит точные химические названия выделенных соединений, составленные в соответствии с правилами номенклатуры ИЮПАК, и ограничивается производными от тривиальных названий.

Стр. 95-97. Одновременно упоминаются регулируемые процессы (например, «клеточная миграция»), регулируемые взаимодействия белков, регулируемый уровень экспрессии и регулируемые белки. Материал трудно воспринимается.

Стр. 97. Не указаны номера белковых пятен, выбранных из таблицы 4; то же для описания последующих экспериментов по глобальному протеомному скринингу.

Стр. 99, 106. Следует дать описание стадий «гипузинирования».

Стр. 110. В тексте следует придерживаться одного способа обозначения вещества: или тривиальное название, или буквенное сокращение, или номер химической структуры. Например, или «пульхранин А», или «РСН-А», или «алкалоид 20».

С чем связано разнообразие моделей, использованных для исследования противоопухолевых свойств низкомолекулярных соединений?

При обсуждении результатов автор недостаточно внимания уделил установлению связи между химической структурой и биологическим действием исследованных веществ. Не ясно, на какие фрагменты структуры могут быть ориентиром для поиска других веществ или их модификаций с аналогичной активностью.

В тексте присутствуют опечатки, а также грамматические и синтаксические ошибки.

Заключение. Работа открывает новые направления и перспективы исследования морских природных соединений и их аналогов. Упомянутые выше замечания несколько не портят общее впечатление о работе и не снижают её научную и практическую ценность. Автором работы пройден полный путь от идентификации активных веществ до исследования механизмов их противоопухолевого действия *in vitro* и *in vivo*. Основные результаты были опубликованы в ведущих международных научных журналах по тематике исследования. Работа С.А. Дышлогого обладает высоким уровнем научной новизны, имеет завершённый характер, выбранная тема является актуальной, а все выводы обоснованным. Таким образом, по совокупности признаков работа Дышлогого Сергея Анатольевича соответствует всем требованиям ВАК РФ, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук (п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 г.), а ее автор заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.04 – Биохимия.

13 декабря 2018 г.

Главный научный сотрудник,
доктор биологических наук



А.Б. Имбс

Министерство науки и высшего образования РФ

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

«Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского»

Дальневосточного отделения Российской академии наук

690041, г. Владивосток, ул. Пальчевского, д. 17

Тел.: +7(423)2317339, e-mail: andrey_imbs@hotmail.com

