

ОТЗЫВ

официального оппонента Щекотихина Андрея Егоровича
на диссертационную работу Белоглазкиной Анастасии Александровны
«Новые низкомолекулярные ингибиторы белок-белкового взаимодействия p53-MDM2 на
основе диспироиндолинонов»
по специальности 02.00.03 – Органическая химия

Актуальность темы работы. Поиск оптимальных способов повышения эффективности лечения онкологических заболеваний при помощи доступных и безопасных лекарственных препаратов является важной современной задачей. Клеточный белок p53 представляет собой опухолевый супрессор, играющий важную роль в жизненном цикле клетки и ее апоптозе, а белок MDM2 способен связываться с ним и выполнять регуляторную функцию. В рамках работы А.А. Белоглазкиной был предложен подход к решению вышеуказанной проблемы, заключающийся в блокировании взаимодействия этих двух белков путем встраивания молекулы ингибитора, имеющего жёсткий структурный каркас, в гидрофобный карман белка MDM2, вследствие чего высвобождающийся p53 активирует процесс разрушения опухоли. Стратегия синтеза конформационно-жёстких ингибиторов p53-MDM2 является актуальной, перспективной и востребованной в области органической и медицинской химии.

Общая структура работы. Диссертация состоит из пяти разделов: введения, обзора литературы на тему «Способы получения и применение спирооксиндолов», обсуждения результатов, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 186 страницах текста и включает 27 рисунков, 16 таблиц и список цитируемой литературы из 148 наименований.

В обзоре литературы в первой части подробно обсуждается механизм p53-MDM2 взаимодействия, рассматриваются синтетические подходы к созданию ингибиторов этого взаимодействия; вторая часть обзора литературы посвящена методам получения спирооксиндолов как в ахиральном, так и энантиоселективном варианте. Обзор завершается кратким резюмированием и обобщением рассмотренных методов с указанием наиболее перспективных направлений поиска ингибиторов p53-MDM2 взаимодействия и эффективных подходов к синтезу спироиндолиноновых систем.

Новизна проведенных исследований и полученных результатов состоит в том, что автором впервые были разработаны и оптимизированы методы получения диспироиндолинонов различных структурных типов, проведено исследование *in vitro* их цитотоксичности и эксперименты по установлению механизма действия. В каждом из полученных классов диспиропроизводных обнаружены соединения, способные ингибировать опухолевые клетки различного гистогенеза, включая линии с активированными механизмами резистентности. Получены данные о связи структура-активность, оценено влияние заместителей и отдельных структурных фрагментов диспиропроизводных на антипролиферативную активность.

Степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов, рекомендаций и заключений. Работа прошла успешную апробацию на российских и международных конференциях и симпозиумах и выполнена на современном научном уровне. Для идентификации новых соединений автор успешно применил комплекс физико-химических методов анализа: ^1H ЯМР-спектроскопию, а также масс-спектрометрию высокого разрешения и рентгеноструктурный анализ. Наиболее важные результаты исследований опубликованы в рецензируемых российских и зарубежных журналах, индексируемых в базе данных Web of Science, Scopus и РИНЦ и рекомендованных диссертационным советом МГУ для представления материалов кандидатской диссертации. Таким образом, уровень и достоверность полученных результатов не вызывают сомнений.

Значимость результатов, полученных в работе, для науки и практики. Работа Белоглазкиной А.А. имеет важное научное и практическое значение, так как в рамках данной работы была получена большая библиотека неизвестных ранее диспироиндолинонов, исследована их способность ингибировать пролиферацию различных линий опухолевых клеток. В рамках диссертационной работы также было проведено исследование возможности получения диспиропроизводных в энантиомерно чистом виде, представляющее отдельную сложную задачу. Автором были получены достоверные результаты о биологическом потенциале синтезированных диспироиндолинонов с использованием методов МТТ, western-blot, исследования механизма апоптоза и p53-активации. В дальнейшем, полученные диспироиндолиноны могут быть перспективны для исследования специфической активности *in vivo* и последующей разработки нового поколения противоопухолевых препаратов.

Публикации по теме работы. По материалам диссертационной работы опубликовано 22 печатные работы: 3 статьи в российских и международных научных изданиях, индексируемых международными базами данных (Web of Science, Scopus) и рекомендованных Диссертационным Советом МГУ, 2 патента и 17 тезисов докладов на российских и международных научных конференциях.

Таким образом, на основании анализа текста работы и публикаций автора можно заявить, что **цели** работы, сформулированные во введении, автором **достигнуты**, и соответствующие им **задачи выполнены**. Представленные в работе **научные положения, выводы и рекомендации** являются обоснованными. Автореферат и публикации **полностью отражают** содержание диссертационной работы.

Замечания. Работа выполнена на высоком экспериментальном и теоретическом уровне, однако на некоторые критические замечания следует обратить внимание:

1. В описании спектров ЯМР полученных соединений имеется ряд недочетов. Прежде всего, двумерные спектры на рис 7-9 не соответствуют структуре диспироиндолинона **61** и ^1H ЯМР-спектру этого соединения (рис. 6). На представленных двумерных спектрах имеется ряд несоответствий: так например не ясно, что за сигналы наблюдаются в области 1-0 м.д.
2. Структура соединения **63**, определенная методом РСА (рис 10), не соответствует приписываемой формуле, а также ни одной из структур его аналогов, представленных в таблице 5 или описанных в экспериментальной части.
3. На стр.68 указано, что «среди двух наиболее активных по данным биологического тестирования в МТТ-тесте соединений **49** и **63** в ходе дальнейших углубленных биологических исследований было выбрано соединение **63**», однако представленные в таблице 6 данные показывают, что оба соединения полностью неактивны для всех линий опухолевых клеток в концентрации >100 мкМ.
4. В работе отсутствуют важные спектральные и физико-химические константы для новых соединений. Так, в работе полностью отсутствуют ^{13}C ЯМР-, ИК, УФ-спектры, данные элементного анализа для синтезированных веществ, однако в экспериментальной части (стр. 101) указаны марки приборов, на которых эти исследования проводились. Отсутствуют данные о методах ВЭЖХ анализа, системах и колонках, на которых проводился хроматографический анализ и препаративное разделение стереоизомеров, а также сведения о хроматографической подвижности, данные о чистоте полученных продуктов.

5. Исследованные биологические свойства полученных веществ автор называет «цитотоксичность» или даже «противоопухолевой активностью». Однако МТТ-тест, используют, прежде всего, для исследования влияния веществ на пролиферацию опухолевых клеток (антипролиферативную активность). При описании скрининга NCI, автор использует параметр «IC₅₀». Однако, в NCI для оценки потенциала веществ обычно используют три параметра - GI₅₀, TGI, LC₅₀, поэтому не понятно какой из параметров приведен в таблице 15. Неясно, по какому параметру оценивалась активность p53 – что значит 4.0 to 5.0? На стр. 65 отмечено, что под действием тестируемого вещества наблюдалось увеличение «экспрессии проапоптотических белков PUMA и CASP», однако на представленном вестерн-блоте (рис. 15) наблюдается дозозависимое снижение количества проапоптотических белков, да и уровень p53 в клетках существенно ниже, чем для препарата сравнения нутлина.
6. Небрежное оформление, ряд опечаток, неудачных фраз и терминов, несколько снижают общее хорошее впечатление о диссертационной работе: «MDM2 является продуктом транскрипции генов белком p53»; «заменой нитро-группы на амино-группу»; «улучшение цитотоксичности», «линиям НСТ различной морфологии»; «диспириозводные»; «параменты»; «раковых клеточных линиях ... НЕК» и др. Имеется ряд ошибок в структурных формулах и названиях веществ: ошибки в структуре нитулина 3а (схема 1), соединения 11 (схема 2). Часто встречаются ошибки в нумерациях соединений и схем: одно и то же соединение имеет два номера - 36 и 37 (схема 6); на стр. 72 производное 34 имеет на схеме номер 18 и т.д. Список цитируемой литературы выполнен с нарушением требования к оформлению библиографических описаний в соответствии с ГОСТ 7.1-2003. Перепутана нумерация ссылок, например содержание работы 107 на стр. 49 не соответствует тексту.

Тем не менее, отмеченные замечания не снижают научной значимости исследования и не влияют на достоверность, а также основные выводы, сделанные в работе.

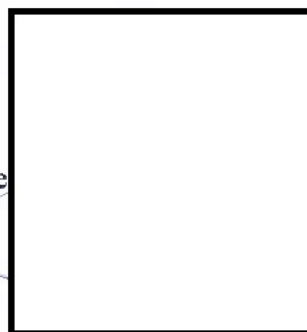
Заключение по диссертационной работе. Резюмируя вышесказанное, можно утверждать, что Белоглазкиной А.А. выполнено оригинальное научное исследование в области разработки противоопухолевых лекарственных препаратов. По актуальности поставленных задач, научной новизне, достоверности, теоретической и практической значимости результатов, степени обоснованности выводов, объему выполненных исследований диссертация отвечает требованиям, установленным Московским

государственным университетом имени М.В. Ломоносова работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 02.00.03 - «органическая химия» (по химическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова, а также оформлена, согласно положениям №5,6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Таким образом, соискатель Белоглазкина Анастасия Александровна заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.03 - «органическая химия»

Официальный оппонент:

Профессор РАН, доктор химических наук,
Директор
Научно-исследовательский институт
по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе



Щекотихин А.Е.

Контактные данные:

Тел.:

E-mail:

Специальность, по которой официальным
оппонентом защищена диссертация
02.00.03 - «органическая химия»

Адрес официального места работы:

Подпись Щекотихина А.Е. удостоверяю
Ученый секретарь к.х.н.

ФГБНУ Научно-исследовательский институт
по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе



Кисль О.В.