

ОТЗЫВ

Официального оппонента на диссертацию Дмитрия Львовича Аминина на тему: «Молекулярные механизмы иммуномодулирующего действия кукумариозида A_2-2 и созданного на его основе лекарственного средства кумазида», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия

Актуальность темы. Морские гидробионты являются ценным возобновляемым источником лекарственных средств, традиционно используемых в народной медицине. В последнее время, благодаря установлению химического состава и биологической активности веществ, выделяемых из морских организмов, были получены уникальные агенты с широким спектром фармакологических эффектов. В ряду этих соединений особый интерес вызывают морские гликозиды и их структурные комбинации с фармаконами других типов. Известно, что нативные формы эндогенных биорегуляторов часто существуют в гликозилированной форме, что резко усиливает их коммуникативные и транспортные функции, в том числе афинность к клеточным мишеням. Вместе с тем, усложнение биогенных молекул гликозидными остатками приводит к определенным трудностям в изучении их эффектов в организме, так как присущий им обычно политаргетный механизм действия требует применения современных сложных инструментальных клеточных и молекулярных методов исследования. Возможно поэтому, несмотря на возрастающее количество разрозненных исследований, посвященных биохимическим и фармакологическим свойствам соединений из морских организмов, практически не встречается работ с глубоким обсуждением их механизмов действия и всесторонним анализом специфических и системных эффектов в организме. Диссертационная работа Д.Л. Аминина, представляющая собой комплексное исследование молекулярных и клеточных механизмов иммуномодулирующего действия тритерпенового гликозида из голотурии кукумариозида A_2-2 и его структурного аналога кумазида, является фундаментальным научным трудом и вносит существенный вклад в развитие современной гликобиологии. Актуальность работы также связана с поиском новых эффективных лекарственных агентов с иммуностимулирующей активностью среди

природных низкомолекулярных соединений, высокий спрос на которые сохраняется ввиду роста иммунодефицитных состояний, обусловленных воздействием неблагоприятных экологических факторов, а также различных патогенов.

Исходя из целей исследования, автором были поставлены задачи, включавшие изучение не только специфической иммуотропной активности у тритерпеновых гликозидов голотурий, но и их токсичности (острой и хронической), мутагенного и репродуктивных эффектов (эмбриотоксического и тератогенного), а также фармакокинетики. Основное внимание Дмитрия Львовича было направлено на изучение специфического влияния соединений на различные системы клеточного и гуморального иммунитета, а также на исследование механизмов взаимодействия агентов с иммунокомпетентными клетками (макрофагами, лейкоцитами, спленоцитами) и установление внутриклеточных и мембранных мишеней, вовлеченных в иммуномодулирующее действие. Иммуностимулирующий эффект терпеновых гликозидов исследовался на моделях иммунодефицитных состояний у животных, обусловленных злокачественным ростом или облучением.

Масштабность задач, поставленных автором, определила выбор широкого круга моделей, тест-объектов и инструментальных методов анализа, которые использовались при проведении экспериментов *in vitro*, *in vivo* и *in silico*.

Оценка содержания диссертации ее завершенности в целом. Диссертационная работа Д.Л. Аминина, объемом 310 страниц, содержит введение, обзор литературы, главу с изложением материалов и методов исследования, главу с изложением результатов собственных исследований и их обсуждением, заключение, выводы и список литературы, включающий 484 источника в основном иностранных авторов. Работа иллюстрирована рисунками (90), схемой и таблицами (50). С точки зрения раскрытия темы и реализации поставленных соискателем задач структура и объем диссертации представляются адекватными заявленным целям.

Обзор литературы состоит из нескольких разделов, в которых подробно анализируются структурные особенности и основные виды биологического действия тритерпеновых гликозидов. Рассматриваются вопросы их взаимодействия с клеточными мембранами и механизмы мембранолитического эффекта. Особое внимание уделяется рассмотрению иммуностимулирующей и противоопухолевой активности кукумариозидов и их структурных аналогов, а также структурным особенностям и биологической роли пуриновых рецепторов и их лигандов. Литературные данные достаточно полно отражают современное состояние поднятых в диссертации вопросов, логично обосновывают цель и задачи диссертационного исследования, сформулированные в работе.

Раздел с изложением собственных результатов делится на части, посвященные исследованию целевых видов активности. Существенное место в работе уделяется исследованию механизмов иммуномодулирующего действия кукумариозида А₂-2 и кумазида на клеточном и субклеточном уровнях. В частности, с помощью техники молекулярных флуоресцентных зондов, спектрофлуориметрии, конфокальной микроскопии и анализа флуоресцентного изображения клеток автором получены многочисленные доказательства стимулирующего влияния моносульфатированных тритерпеновых гликозидов из голотурии на активацию макрофагов. Это выражается в повышении их адгезивных свойств, подвижности, распластывания, что имеет большое значение для миграции макрофагов в очаг инфекции, передачи стимулирующих сигналов другим эффекторным клеткам и способности к фагоцитозу. При обработке перитонеальных макрофагов кукумариозидом А₂-2 и его структурными аналогами в нецитотоксическом диапазоне концентраций Д.Л. Амининим выявлено повышение лизосомальной активности, что предшествует активации фагоцитоза. Данный эффект был подтвержден *in vivo* в дозах на два порядка меньше, чем токсические. Показано, что иммуностимулирующий эффект гликозидов сопровождается увеличением в макрофагах активных форм кислорода, что, как известно, является основным механизмом киллинга инфекционных микроорганизмов. Установлено, что препарат кумазид в низких дозах также

стимулирует клеточный и гуморальный иммунитет путем усиления фагоцитарной и бактерицидной активности лейкоцитов крови человека, повышает выделение ФНО-альфа мононуклеарными клетками, увеличивает продукцию активных форм кислорода. Показано, что действие кумазида приводит к восстановлению уровня экспрессии CD3-, CD4- и CD8-антигенов лимфоцитов периферической крови здоровых доноров на фоне подавления их экспрессии гидрокортизоном. Кроме того, кумазид, не влияя на выраженность реакции гиперчувствительности замедленного типа у животных, увеличивает число антителообразующих клеток к эритроцитам барана в селезенке, а также повышает устойчивость животных к некоторым видам патогенных микроорганизмов.

Наиболее важные результаты работы касаются изучения молекулярных механизмов иммуномодулирующего действия кукумариозида A_2-2 и кумазида. Показано, что он тесно связан с их влиянием на мембраны иммунокомпетентных клеток, что влечет изменение их физико-химических свойств, прежде всего микровязкости. Это вызывает обратимое изменение мембранного потенциала, деполяризацию мембран и резкое повышение уровня ионов Ca^{2+} в цитоплазме за счет его поступления из внеклеточного пространства. Известно, что кальций является регулятором многих внутриклеточных метаболических процессов, в том числе биоэнергетических, секреторных и пролиферативных, участвует во внутриклеточном сигналинге, взаимодействует с сократительными белками клетки. С помощью метода оптического имаджинга, а также с применением блокаторов мембранных белков-транспортёров Ca^{2+} , Д.Л. Аминин подтвердил прямую зависимость между внутриклеточным повышением уровня этого иона под влиянием кукумариозида A_2-2 и активацией макрофагов.

В серии экспериментов на макрофагах автором были получены важные результаты, касающиеся молекулярных механизмов взаимодействия кукумариозида A_2-2 с пуриновыми рецепторами P2X, как наиболее вероятными мишенями, ответственными за иммуномодулирующий эффект. Проведенный ингибиторный анализ с использованием селективных агонистов этих рецепторов показал, что основными мишенями кукумариозида являются рецепторы P2X1 и,

главным образом, P2X₄, при этом необходимо наличие в среде молекул АТФ. Непосредственное взаимодействие кукумариозида А₂-2 с P2X₄-рецептором мыши было подтверждено методом поверхностного плазмонного резонанса. Данные результаты имеют приоритетное значение.

Путем молекулярного моделирования сайта связывания P2X₄-рецептора мыши и докинга кукумариозида А₂-2 Д.Л. Амининим установлено, что на мембранах макрофагов мыши существуют как минимум два сайта связывания вещества (высокоаффинный и низкоаффинный), характеризующихся различными константами диссоциации. Показано, что сам рецептор меняет конформацию в результате связывания с гликозидом, при этом сайт связывания эндогенного лиганда АТФ остается свободным; что позволило автору сделать вывод о том, что гликозиды голотурий являются аллостерическими модуляторами активности P2X рецепторов. С использованием метода ПЦР и последующего иммуноцитохимического типирования перитонеальных макрофагов, установлено, что в перитонеальной полости мыши присутствует популяция крупных зрелых F4/80+макрофагов, характеризующихся наличием высокой плотности пуриновых рецепторов P2X₁ и P2X₄ типа, которые принимают участие в Ca²⁺ ответе на применение кукумариозида А₂-2. В результате анализа полученных данных, автором предложена концепция молекулярного механизма иммуномодулирующего действия тритерпеновых гликозидов голотурий.

Следует отметить, что большинство упомянутых выше результатов получены впервые, имеют высокую научную ценность и соответствуют мировому уровню. Достоверность данных не вызывают сомнений, так как подтверждается использованием большого арсенала современных биохимических и молекулярных методов исследования, таких как ПЦР, проточная цитофлуорометрия, ИФА, флуоресцентные методы визуализации, иммуноблоттинг, метод пэтч-кламп, *MALDI-TOF-MS* анализ, поверхностный плазмонный резонанс (*SPR*) и другие.

Остальные разделы работы Д.Л. Аминина включают исследование острой токсичности, безвредности, репродуктивных эффектов (эмбриотоксический, тератогенный), мутагенности и фармакокинетики препарата кумазид. В данной

части работы используются в основном известные модели и методы, описанные в руководствах для проведения доклинических испытаний новых агентов. Здесь хотелось бы обратить внимание на то, что (за исключением острой токсичности) все испытания проводились при низких дозах, что вызывает определенные вопросы. Так, доза кумазида в хроническом опыте была в 500 раз, а в эксперименте с оценкой репродуктивной токсичности – в 100–1000 раз меньше, чем LD_{50} . Обычно для исследования хронической токсичности веществ, относящихся к IV классу токсичности, рекомендуется выбирать дозу не меньше 1/20 от величины LD_{50} и длительность введения от 4-х месяцев. При этом вторая испытываемая доза должна быть близка к рекомендуемой терапевтической. Поскольку в работе этот принцип не соблюдался, то считаю, что в данном случае делать вывод об отсутствии у препарата токсичности можно только применительно к соответствующему дозовому диапазону.

Данные фармакокинетического анализа при внутрибрюшинном введении, на мой взгляд, указывают на двухкамерную модель распределения агента и возможное депонирование вещества в организме, что согласуется с данными о слабой кумулятивной способности кумазида и, возможно является причиной резкого повышения токсичности по сравнению с пероральным способом введения.

Примерами успешного применения агентов при иммунодефицитных состояниях можно считать результаты экспериментов автора *in vivo*, оценивающих иммуностимулирующие эффекты изучаемых гликозидов на облученных животных и мышах с перевиваемыми опухолями. Профилактическое введение кумазида в условиях летального радиоактивного облучения способствует более быстрому восстановлению клеточности крови, массы кроветворных, лимфоидных и иммунокомпетентных органов, что повышает выживаемость мышей. Профилактическое введение кумазида было также более успешным в отношении задержки роста опухолевых трансплантатов по сравнению с его введением на стадии прогрессивного роста. В данном случае автором предложена теоретическая интерпретация наблюдаемых эффектов.

В целом, диссертационная работа Дмитрия Львовича Аминина представляет собой высококвалифицированное многоплановое исследование, выполненное на высочайшем методическом уровне, результаты которого имеют научное и практическое значение. В частности, получены новые знания о природе иммуномодулирующих эффектов тритерпеновых гликозидов вида голотурия, имеющие фундаментальное значение для гликобиологии, а именно углубляющие понимание молекулярно-клеточных механизмов морских гликозидов, как низкомолекулярных модификаторов биологических реакций. В результате выполненных исследований предложен новый природный иммуномодулятор кумазид, механизм действия которого соответствует принципам доказательной медицины. Полученные данные также свидетельствуют о перспективности дальнейшего поиска фармакологических агентов среди гликозидов этого класса.

Результаты исследования прошли апробацию на всероссийских и международных научных конференциях, материалы диссертации опубликованы в 7 главах книг, в 43 печатных работах, из них 31 статья в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ, получено 5 патентов на изобретение.

Принципиальных замечаний к работе нет. Имеющиеся отдельные неточности в описании условий экспериментов, затрудняющие сравнение данных, не умаляют впечатления о работе, которая хорошо структурирована, имеет четкий стиль изложения и внутреннюю логику. Содержание автореферата соответствует основным положениям диссертации.

При знакомстве с работой возникли вопросы, имеющие уточняющий характер. (1) В каких органах может депонироваться кумазид при внутрибрюшинном введении, исходя из полученных данных о его фармакокинетических параметрах и кумулятивном эффекте? (2) Какой способ введения препарата является наиболее целесообразным/эффективным для терапевтического применения? (3) Можно ли оценить специфический вклад агликоновой и гликоновой частей молекулы тритерпеновых гликозидов в биологические эффекты, описанные в работе?

Заключение. Диссертация Д.Л. Аминина на тему: «Молекулярные механизмы иммуномодулирующего действия кукумариозида А₂-2 и созданного на его основе лекарственного средства кумазид» является законченной самостоятельной научно-квалификационной работой, содержит новые научные результаты имеющих существенное значение для биологии и медицины.

На основании вышеизложенного, считаю, что диссертация Д.Л. Аминина соответствует «Положению о присуждении научных степеней», утвержденному Постановлением Правительства России от 24 сентября 2013 г. №842, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.04 –биохимия.

Официальный оппонент:

Доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник
лаборатории фармакологических исследований
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Новосибирского института органической химии им. Н.Н. Ворожцова
Сибирского отделения Российской академии наук (НИОХ СО РАН)

Адрес: 630090, г. Новосибирск,
проспект Академика Лаврентьева, д.9
benzol@nioch.nsc.ru
<http://web.nioch.nsc.ru/>

Сорокина И. В.

Подпись Сорокиной И.В. заверяю
Зам. директора по науке НИОХ СО РАН
кандидат химических наук



Суслов Е. В.

«06» июня 2018 г.