

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора биологических наук Сорокиной Ирины Васильевны на диссертационную работу Ключовой Любови Сергеевны **«Исследование влияния новых производных фенозановой кислоты и координационных соединений переходных металлов с N-донорными лигандами на жизнеспособность клеток в моделях *in vitro* с помощью многопараметрического скрининга»**, представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4 Биохимия

Актуальность диссертационной работы. Несмотря на значительный прогресс, достигнутый в разработке новых противоопухолевых препаратов, статистические данные свидетельствуют о сохранении высокой смертности от онкологических заболеваний. Существующие подходы в химиотерапии рака, основанные на применении традиционных цитостатиков, так и современных таргетных препаратов, имеют очевидные недостатки и не всегда достижимую эффективность. Поэтому большое внимание исследователей и фармацевтических компаний уделяется разработке новых противоопухолевых препаратов, о чем свидетельствуют данные недавних обзоров о состоянии мирового фармацевтического рынка. При этом не теряет актуальности поиск новых агентов с цитостатическими свойствами, так как эта группа препаратов до сих пор востребована в клинической практике в существующих схемах полихимиотерапии злокачественных опухолей. Основными проблемами, требующими решения в отношении данных агентов, является повышение их селективности и преодоление лекарственной устойчивости опухолевых клеток. В связи с этим, диссертация Ключовой Л.С., посвященная поиску и изучению свойств новых низкомолекулярных цитостатиков, представляет как фундаментальный, так и практический интерес.

Научная новизна. Новизна диссертационной работы Ключовой Л.С. связана прежде всего с выбором в качестве целевых агентов соединений новых структурных типов, к которым относятся как новые водорастворимые алкилированные фенолы (аналоги фенозана), так и оригинальные координационные соединения переходных металлов с N-донорными лигандами, биологические свойства которых до сих пор во многом не изучены. Впервые с помощью методов высокопроизводительного скрининга соискателем исследована

цитотоксическая и цитостатическая активность новых соединений на 2D- и 3D-культурах опухолевых и неопухолевых клеток, а также определено влияние новых соединений на индукцию основных изоформ цитохромов P450, ответственных за метаболизм ксенобиотиков (CYP2C9, CYP2C19 и CYP3A4). Проведено сравнение цитостатических свойств изучаемых соединений с рядом известных препаратов, применяемых в клинике. Впервые изучена цитотоксическая и цитостатическая активность селен- и серосодержащие производные фенозана калия, показано, что его селен-содержащая соль способна усиливать клеточную гибель в концентрациях превышающих 25 мкМ за счет дополнительной генерации активных форм кислорода. Впервые установлено, что среди координационных соединений меди (II), марганца (II) и кобальта (II) с олигопиридинами и производными тетразола, комплексы меди (II) проявляют выраженную дозозависимую цитотоксическую активность, а комплексы марганца (II) – цитостатическую. Нитрозокомплексы рутения проявляют дозозависимую цитотоксическую и цитостатическую активность на 2D- и 3D-моделях клеток. Показано, что фотоиндуцирующее излучение (в режиме 445 нм, 30 мВт, 30 мин) в 2 раза снижает цитотоксическую и усиливает цитостатическую активности комплекса рутения с этилизоникотинатом.

Содержание и оформление диссертации. Диссертационная работа оформлена согласно существующим стандартам и состоит из введения, обзора литературы (глава 1), материалов и методов (глава 2), результатов (глава 3), обсуждения результатов (глава 4), выводов, заключения, списка сокращений и условных обозначений и списка литературы. Работа изложена на 153 страницах машинописного текста, содержит 43 рисунка и 17 таблиц. Библиографический список включает 374 источника, в том числе работы, опубликованные за последние пять лет.

Введение отражает актуальность работы, научную новизну и теоретическую и практическую значимость. Цель исследования сформулирована четко, поставленные задачи соответствуют цели исследования. Автором проведен тщательный анализ большого объема научных публикаций, рассматривающих современные взгляды на поиск и разработку лекарственных препаратов. Обзор литературы включает в себя 4 раздела. В первом подробно рассматриваются современные подходы к поиску лекарств с использованием технологии

многопараметрического скрининга и современных методов клеточной визуализации и анализа изображений. Второй раздел посвящен теоретическому обоснованию эффектов антиоксидантов и их роли в противоопухолевой терапии. В третьем разделе рассматриваются свойства координационных соединений переходных металлов и их использование в качестве противоопухолевых агентов. В четвертом разделе описана роль цитохромов P450 в метаболизме ксенобиотиков. Обзор полностью отражает проблематику работы, а степень обобщения и анализа имеющихся литературных данных свидетельствуют о высоком уровне теоретической подготовки автора.

В главе «Материалы и методы» представлена детализированная информация о методах, применяемых автором на каждом этапе проведенного исследования. В работе использован широкий спектр современных молекулярно-биологических и биохимических методов, включая как традиционные, так и новейшие, еще мало доступные в России, методы многопараметрического скрининга с использованием современной микроскопической техники и дифференцирующих красителей для прижизненного анализа состояния клеток. Данный раздел работы подтверждает высокий экспериментально-методический уровень исследования.

Глава «Результаты» разбита на несколько разделов и подразделов, что последовательно отражает связь с поставленными задачами и облегчает понимание полученных результатов. В первом разделе подробно описывается влияние новых производных фенозановой кислоты на жизнеспособность клеток в стандартных условиях и условиях окислительного стресса. Основным результатом этой части работы являются обнаруженные различия в цитостатической и цитотоксической активности между серо- и селен-содержащими солями – производными фенозан-кислоты. Наиболее перспективным агентом является селен-содержащий алкилфенол. Во втором разделе описаны результаты исследования цитотоксической и цитостатической активности координационных соединений переходных металлов. Тестирование проводилось как на 2D-моделях клеточных культур, так и на сфероидах. В результате автор выявил концентрационные зависимости жизнеспособности и клеточной гибели для девяти комплексов меди, марганца и кобальта, а также для пяти комплексов рутения с различными органическими лигандами в сравнении с противоопухолевыми цитостатиками -

карбоплатином и цисплатином. Показано, что соединения марганца (II) и кобальта (II) оказывают выраженный цитостатический эффект, сравнимый с конвенциональными препаратами. У комплексов рутения обнаружена способность модулировать цитостатическую активность под действием фотоиндуцирующего излучения.

Третий раздел содержит наиболее интересные результаты фенотипического скрининга, полученные с помощью визуализационных методов анализа прижизненных изменений в клетках под действием 12 изучаемых соединений в сравнении с различными по механизму действия лекарственными препаратами. Используя метод двойного окрашивания фиксированных клеток красителями Hoechst и DiD, автор выявил четыре основных типа распределения клеток в популяции, так называемых «популяционных фенотипов», позволяющих предсказать возможные механизмы цитостатических и цитотоксических эффектов по аналогии с известными реперными препаратами. Результаты представлены наглядно в виде гистограмм.

В четвертом разделе представлены результаты влияния двух комплексов меди и пяти нитрозокомплексов рутения на индукцию цитохромов P450. В качестве реперных препаратов использовались классические индукторы дексаметазон и рифампицин. Выявлено модулирующее влияние указанных соединения на экспрессию *CYP2C9*, *CYP2C19* и *CYP3A4* на 2D-культуре клеток гепатоцеллюлярной карциномы HepG2.

В главе «Обсуждение результатов» сделано сопоставление полученных результатов с литературными данными. Основные итоги работы и перспективы дальнейших исследований изложены в заключении. Выводы отражают основные результаты исследования и логично вытекают из поставленных в нем цели и задач.

Степень обоснованности научных положений, выводов, сформулированных в диссертации, их достоверность.

Научная состоятельность полученных результатов обоснована комплексным подходом и использованием современных методов исследования (фенотипический скрининг, целевой скрининг, спектрофотометрические методы, полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) с детекцией в реальном времени). Достоверность результатов обеспечена воспроизводимостью

результатов, прослеживаемой корреляцией данных, полученных различными методами и адекватными методами статистического анализа. Результаты исследования отражены в выводах и в положениях, выносимых на защиту.

Результаты диссертационной работы Ключовой Л.С. прошли апробацию на научных конференциях всероссийского и международного уровня. По теме диссертации опубликовано 5 статей и 7 тезисов в журналах, индексируемых в базах научной литературы Web of Science и Scopus и входящих в список ВАК.

Значимость результатов, полученных автором диссертации, для науки и практики. Полученные в работе результаты представляют как фундаментальный, так и практический интерес. Теоретически значимой является установленная связь между структурой соединений и их влиянием на жизнеспособность клеток. Выявленные закономерности можно будет использовать впоследствии для получения новых соединений с заданными свойствами. Соединения $[\text{RuNOCl}_3(\text{NicMe})_2]$, $[\text{Cu}_2(\text{phen})_2(\text{ФТ})_4]$, $[\text{Cu}_2(\text{bipy})_2(\text{ФТ})_4]$, комплексы марганца(II) и Se-содержащее производное фенозана калия предложены для дальнейших исследований как перспективные противоопухолевые агенты. Фенотипический скрининг на основе красителей Hoechst и DiD в модели *in vitro*, позволяет выявлять соединения, обладающие схожей активностью с препаратами с известным механизмом действия, что в дальнейшем может помочь в установлении потенциальных механизмов действия новых агентов или их возможных побочных эффектов.

Замечания. Принципиальных замечаний к работе не имею. Несколько вопросов носят уточняющий характер.

1. Можно ли считать S- и Se-производные фенозана перспективными цитостатическими агентами для противоопухолевой терапии? Имеются ли данные по противоопухолевой активности фенозана калия и фенозан-кислоты?
2. Какова растворимость координационных соединений переходных металлов с N-донорными лигандами?
3. Какие из изученных соединений обладают выраженной селективной цитотоксичностью в отношении опухолевых клеток и зависит ли это от характера органического лиганда или от типа металла?

Заключение

Диссертационная работа Ключовой Любови Сергеевны «Исследование влияния новых производных фенозановой кислоты и координационных соединений переходных металлов с N-донорными лигандами на жизнеспособность клеток в моделях *in vitro* с помощью многопараметрического скрининга», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4 Биохимия, является законченной научно-квалификационной работой, решающей важную научную задачу – исследование цитотоксических и цитостатических свойств, а также влияния на индукцию цитохромов P450 2C и 3A новых химических соединений современными высокопроизводительными методами. По своей актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости и достоверности полученных результатов работа соответствует требованиям п. 9 Положения о порядке присуждения ученых степеней, предъявляемым к диссертации на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4 Биохимия.

Официальный оппонент:

Ведущий научный сотрудник лаборатории фармакологических исследований Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова Сибирского отделения Российской академии наук» (НИОХ СО РАН), доктор биологических наук (03.03.04 Клеточная биология, цитология, гистология, 14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология)

Сорокина Ирина Е



Дата «15» мая 2022 г.

Адрес: 630090, г. Новосибирск, пр. Ак. Лаврентьева, 9

e-mail: sorokina@nioch.nsc.ru.

Подпись Сорокиной И.В. заверяю

Ученый секретарь НИОХ СО РАН, к.х.н.

Бредихин

