

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Томского НИМЦ

профессор, академик РАН

Степанов В.А.

2022 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ КОМПЕТЕНЦИИ

"Научно-исследовательского института фармакологии и клинической ративной медицины имени Е.Д. Гольдберга" Федерального государственного бюджетного научного учреждения "Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук" о научно-практической ценности диссертации 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», представленной к защите в Диссертационный совет 24.1.242.02 на базе ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия

Актуальность диссертационной работы

Диссертационная работа Ключовой Любови Сергеевны посвящена актуальной задаче – исследованию цитотоксических и цитостатических свойств, а также влияния на индукцию цитохромов P450 2C и 3A новых химических соединений современными высокопроизводительными методами. Несомненную актуальность представляет поиск новых противоопухолевых агентов именно в варианте скрининговых исследований с учетом определения их потенциальных механизмов действия и возможных побочных эффектов.

Автором проведен поиск и анализ актуальных источников литературы, ссылки, используемые в работе, адекватно отражают содержание исследуемой проблемы. Ссылки за последние 5 лет (включая 2022 г.), несомненно, рассматривают современное состояние исследований в данной области.

Показана необходимость поиска новых противоопухолевых агентов, рассмотрено несколько основных направлений в данной области исследований. Диссертант применял современные методы для решения поставленных задач, полученные результаты корректно обработаны и научно интерпретированы.

Исследование выполнено в рамках научно-исследовательских программ Федерального исследовательского центра фундаментальной и трансляционной медицины (ФИЦ ФТМ), а также поддержано поддержано РФФИ в рамках научного проекта №19-34-90129 (руководитель Вавилин В.А.).

Научная новизна

В работе Ключова Любовь Сергеевна впервые подробно исследовала цитотоксические и цитостатические свойства, а также влияние на индукцию цитохромов P450 2C и 3A4 новых соединений, синтезированных научными группами кафедры химии Новосибирского государственного педагогического университета (НГПУ) и Института неорганической химии им. А.В. Николаева (ИНХ СО РАН). Были изучены три группы новых соединений, которые потенциально могут являться противоопухолевыми агентами. Для первой группы, представляющей собой производные фенозановой кислоты, было показано, что селен- и серосодержащие производные фенозана калия имеют низкую цитотоксическую и цитостатическую активность, их антиоксидантная активность подтверждена в модели окислительного стресса, индуцированного H_2O_2 . Впервые установлено, что исследованные халькогенсодержащие фенольные соединения способны усиливать клеточную гибель некоторых типов клеток в концентрациях $> 25 \text{ мкМ}$ при дополнительной генерации активных форм кислорода.

Для второй группы новых соединений, представляющих собой координационные соединения эссенциальных металлов (меди(II), марганца(II) и кобальта(II)) с олигопиридинами и производными тетразола показано, что комплексы меди(II) проявляют выраженную дозозависимую цитотоксическую активность, а комплексы марганца(II) – цитостатическую, наличие производного тетразола влияет на селективность комплексов для разных типов клеток и цитостатическую и цитотоксическую активность для 3D-культуры.

Для третьей группы, представленной нитрозокомплексами рутения, показано, что фрагменты изоникотиновой и никотиновой кислоты, также как и фрагменты метилового и этилового эфира в структуре нитрозокомплекса рутения существенно влияют на цитотоксическую и цитостатическую активность комплексов рутения. Активность комплекса с γ -пиколином соответствует активности соединения с метилизоникотинатом. Фотоиндуцирующее излучение (445 нм, 30 мВт, 30 мин) в два раза снижает цитотоксическую и усиливает цитостатическую активности комплекса с этилизоникотинатом.

Впервые исследовано влияние полученных оригинальных соединений на экспрессию основных цитохромов P450, ответственных за метаболизм лекарств.

Впервые показана возможность применения фенотипического скрининга на основе красителей Hoechst и DiD в *in vitro* модели фиксированных клеток для выявления соединений, обладающих активностью, схожей с активностью соединений с известным

механизмом действия. Выявлены фенотипические изменения клеток, характеризующие митотическую катастрофу.

Содержание и оформление диссертации

Диссертация оформлена в соответствии с существующими требованиями и изложена на 153 страницах машинописного текста, содержит 43 рисунка и 17 таблиц. Работа 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, включающего 374 источника.

Во введении представлены актуальность, степень разработанности темы исследования, цель и задачи, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, методология и методы исследования, положения, выносимые на защиту, личный вклад соискателя, апробация результатов и степень достоверности.

В главе 1 автором изложен обзор литературы, в котором представлен обширный материал по теме диссертации. Обзор отражает современные представления о подходах к поиску и открытию новых лекарственных препаратов, в частности противоопухолевых. Обзор представлен в виде 4 разделов: первый посвящен современным технологиям исследований в области открытия лекарств, второй – роли антиоксидантов в противоопухолевой терапии, третий – координационным соединениям переходных металлов в противоопухолевой терапии, четвертый сосредоточен на метаболизме ксенобиотиков и на роли цитохромов P450 (CYP), очень подробно рассмотрены механизмы транскрипционной регуляции CYP2C9, CYP2C19 и CYP3A4. Глава хорошо иллюстрирована, включает в себя как схемы из литературных источников, так и суммированные представления автора по тому или иному вопросу на основе анализа литературы, например автором составлены очень подробные схемы транскрипционной регуляции цитохромов P450.

Во второй главе представлены новые исследуемые соединения и подробно освещены методы исследования.

В третьей главе представлены собственно результаты исследования, дана оценка цитотоксической и цитостатической активности новых соединений, подробно рассмотрено влияние новых производных фенозановой кислоты на жизнеспособность клеток человека в стандартных условиях и условиях окислительного стресса, установлены связи между структурой соединения и его биологической активностью. Также проведена оценка влияния новых координационных соединений переходных металлов на индукцию цитохромов P450. Описаны результаты, полученные методом двойного окрашивания

фиксированных клеток красителями Hoechst и DiD. Результаты представлены в виде таблиц и графиков.

Четвертая глава посвящена обсуждению полученных результатов. Автор корректно сопоставляет результаты проведенных исследований с данными опубликованных работ, посвященных изучаемой проблеме.

В заключении изложены основные итоги исследовательской работы и рассмотрены перспективы дальнейшего исследования. Автором сделано 6 выводов, которые отражают основные результаты исследования и логично вытекают из них.

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

Результаты исследования отражены в положениях, выносимых на защиту и выводах. Цель диссертационного исследования соответствует выбранной теме, выводы соответствуют поставленным задачам. Работа выполнена на высоком методологическом уровне, достоверность полученных результатов подтверждена воспроизводимостью и согласованностью данных различных методов исследования и адекватным статистическим анализом. В качестве методов исследования использовались современная технология многопараметрического скрининга, молекулярно-биологические и биохимические методы (фенотипический скрининг, целевой скрининг, спектрофотометрические методы, полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) с детекцией в реальном времени).

Значимость результатов, полученных автором диссертации, для науки и практики

Полученные результаты исследования имеют методическое, практическое и теоретическое значение. Полученные результаты подробно описывают цитотоксические, цитостатические, антиоксидантные и модулирующие цитохромы P450 3A4, 2C9 и 2C19 свойства новых оригинальных соединений. Установлено, что среди координационных соединений меди(II), марганца (II) и кобальта(II) с олигопиридинами и производными енамина и тетразола комплексы меди(II) проявляют выраженную дозозависимую цитотоксическую активность, тогда как комплексы марганца(II) и кобальта(II) – цитостатическую. Соединения с 5-фенилтетразолат анионом селективно воздействуют на разные типы клеток, тогда как соединение с 5-метилтетразолат анионом проявляет общую токсичность. Среди комплексов с 5-фенилтетразолат анионом комплексы с 2,2'-бипиридином и его производным менее активны на 3D-культуре HepG2, активность комплексов с 1,10- фенантролином сохраняется. Для производных фенозановой кислоты

показано, что гидрофильные производные фенозановой кислоты не влияют на митохондриальный мембранный потенциал HepG2 и MCF-7 как в стандартных условиях, так и в модели окислительного стресса, индуцированного H₂O₂, Se-содержащая соль оказывает антиоксидантное действие на некоторые типы клеток (Hep-2, HepG2 и MCK), в то время как на клетки MCF-7 в концентрациях выше 25 мкМ – усиливает клеточную гибель. Дозозависимый цитотоксический и цитостатический эффект нитрозокомплексов рутения в большей степени зависит от производного пиридина и в меньшей степени от фрагмента метилового или этилового эфиров, фотоиндуцирующее излучение влияет на активность комплекса с этилизоникотинатом. Установленные закономерности изменений биологических свойств в зависимости от структуры комплексов могут быть впоследствии использованы для направленного синтеза новых соединений с заданными функциональными свойствами. Из изученных соединений обозначен ряд для дальнейших исследований в качестве потенциальных противоопухолевых агентов исследований: [RuNOCl₃(NicMe)₂], [Cu₂(phen)₂(ФТ)₄], [Cu₂(bipy)₂(ФТ)₄], комплексы марганца(II) и Se-содержащее производное фенозана калия. Оригинальной частью диссертационной работы является фрагмент, посвященный разработке и постановке фенотипического скрининга на основе красителей Hoechst и DiD в *in vitro* модели фиксированных клеток для выявления соединений, обладающих активностью, схожей с активностью соединений с известным механизмом действия. В работе выявлены фенотипические ландшафты для новых соединений и соотнесены с фенотипическими ландшафтами уже известных лекарств. Дальнейшее исследование этим методом лекарств, применяемых в клинике, и анализ их фенотипических ландшафтов может помочь в установлении потенциальных механизмов действия новых агентов или их возможных побочных эффектов.

Автореферат отражает основные положения диссертации и оформлен в соответствии с современными требованиями. По материалам диссертации опубликовано 5 работ в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации для опубликования основных научных результатов кандидатских и докторских диссертаций.

Заключение.

Таким образом, 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 – обоснования применения высокопроизводительных методов при исследовании цитотоксических и цитостатических свойств, а также влияния на индукцию цитохромов P450 2C и 3A новых химических соединений для определения их потенциальных механизмов действия и возможных побочных эффектах.

Диссертационная работа Ключовой Л. С. по актуальности, научной новизне, практической ценности и достоверности полученных результатов, полноте изложения и обоснованности выводов соответствует требованиям пункта 9 Положения о порядке присуждения ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 (в ред. Постановления Правительства РФ от 11.09.2021 №1539), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

Отзыв на диссертационную работу Ключовой Л. С. заслушан, обсужден и одобрен на совместном заседании лаборатории онкофармакологии, иммунофармакологии и лаборатории физиологии, молекулярной и клинической фармакологии «НИИ фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга» Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», протокол № 4 от «03» ноября 2022 г.

Заместитель директора по научной и лечебной работе, заведующий лабораторией физиологии, молекулярной и клинической фармакологии, доктор медицинских наук (14.03.06 фармакология, клиническая фармакология), профессор, член-корреспондент РАН _____ Удуд Владимир Васильевич
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук» (Томский НИМЦ)

Адрес: 634009, г. Томск, пер. Кооперативный, 5.

Тел.: +7 (3822) 51-22-28

e-mail: center@tnimc.ru

_____ В. В. заверяю:

_____ оного НИМЦ,

_____ Хитринская Ирина Юрьевна

07.11.2022г.