

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу

Тохтуевой Марии Дмитриевны

«Исследование противоопухолевой активности циклоплатинированных соединений и оценка их роли в запуске программируемой клеточной гибели в злокачественно перерожденных клетках», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности

1.4.16 – Медицинская химия

Одной из основных задач медицинской химии является создание новых противоопухолевых соединений с уникальным механизмом действия. Онкологические патологии стоят на лидирующем месте среди причин преждевременной смертности, что определяет высокую значимость и актуальность эффективного поиска новых терапевтических агентов для противоопухолевой терапии. Среди всех лекарственных средств, используемых для лечения злокачественных новообразований соединения платины, занимают особое, привилегированное положение. Для платиновых лекарств взаимодействие с ДНК и запуск апоптоза является общепризнанным механизмом действия и поэтому поиск соединений с отличным механизмом действия является актуальным направлением исследований в данной области.

Диссертационная работа Тохтуевой М. Д. посвящена важной и актуальной области медицинской химии — *in vitro* тестирование сконструированных и синтезированных соединений на предмет изучения особенностей их взаимодействия с молекулярными мишенями организма. В ходе работы было выполнено систематическое доказательство наличия у новых циклоплатинированных соединений механизма клеточной гибели, отличного от классических платиновых лекарственных препаратов.

Целью представленной диссертационной работы является изучение противоопухолевых свойства серии комплексов платины(II)

арилбипиридинов, определение механизм индукции клеточной смерти для соединения-лидера и разработка на его основе пролекарства платины(IV) с верификацией основной молекулярной мишени.

Актуальность темы диссертационного исследования заключается в поиске подходов к преодолению основных побочных эффектов классических платиновых препаратов за счет создания новых соединений платины, принципиально отличающихся по структуре от применяемых в настоящее время цисплатина, карбоплатина и оксалиплатина. Сохранение платинового ядра, как небιοгенного металла, позволяет предположить сохранение токсичного действия. В то же время модификация лигандного окружения, геометрии комплекса или других параметров молекулы способна изменить механизм цитотоксического действия, а также спектр молекулярных мишеней, что способно снизить как побочные явления, так и изменить резистентность к различным типам опухолей. Поэтому представленная работа, заключающаяся в выявлении детального механизма цитотоксического действия, подтверждении мишени и создании пролекарственной формы соединения-лидера, является **актуальной и перспективной**.

Научная новизна работы заключается в том, что диссертант показал для циклоплатонированного соединения-лидера, отобранного на основании *in vitro* тестирования цитотоксичности, новый, нехарактерный для классических платиновых комплексов механизм клеточной гибели через запуск ферроптоза. Структура пролекарства Pt(IV) была сконструирована на основе изменения структуры соединения-лидера Pt(II), что позволило сохранить механизм клеточной гибели. Данная работа расширяет понимание структура-активность в ряду цитотоксичных комплексов платины.

Диссертационная работа построена по классической форме и состоит из следующих частей: введение, обзор литературы, экспериментальная часть, обсуждение результатов, заключение, список литературы и список обозначений и сокращений. Диссертация изложена на 141 странице печатного

текста, хорошо иллюстрирована рисунками и схемами, данные структурированы в таблицах. Список цитируемой литературы включает 143 наименования.

Во введении поставлена цель работы, подчёркивающая, что различные проблемы, связанные с использованием комплексов Pt(II), в первую очередь многочисленные побочные явления и резистентность, требуют разработки иных подходов — таких как поиск соединений с альтернативными механизмами действия и создание пролекарственных форм Pt(IV). Изложена актуальность темы, степень её разработанности в литературе, научная новизна, практическая и теоретическая значимость работы, выносимые на защиту положения, апробация работы, методология и методы исследования.

Литературный обзор состоит из нескольких взаимосвязанных разделов. В самом начале дается краткая характеристика важности борьбы со злокачественными новообразованиями и существующими методами лечения, с концентрацией на химиотерапии. Затем рассмотрены применяемые во всем мире и одобренные регионально противоопухолевые комплексы платины. Отдельный раздел посвящен соединениям платины, находящимся на стадиях клинических испытаний. Подробно рассмотрены механизмы действия классических платиновых лекарств и описаны их доказанные молекулярные мишени. Следующий раздел описывает основные концепции методов клеточной гибели. Подробно рассмотрены апоптоз, ферроптоз, некроптоз, аутофагия, праптоз. Для каждого типа гибели подробно рассмотрены механизмы, основные биохимические каскады и маркеры. Так как диссертация посвящена соединениям платины, для каждого типа клеточной гибели приведены примеры комплексов платины, для которых был доказан особый метод гибели. Для каждого раздела сделаны выводы и сделано общее обобщение по всему литературному обзору, что связывает его с обсуждением результатов, полученных диссертантом. Таким образом, обзор полностью соответствует тематике собственного диссертационного исследования

Тохтуевой М. Д., содержит необходимую информацию для оценки степени **новизны и значимости** полученных автором результатов. В обзоре приведены данные по более чем 90 источникам, в основном опубликованным в последнее десятилетие и, более того, зачастую в последние несколько лет, что указывает на современность и востребованность данного направления исследований.

Собственные достижения Тохтуевой М. Д. как в части отбора соединения-лидера на основании *in vitro* скрининга, так и в части доказательства механизма действия этого соединения и его пролекарственной формы, подробно изложены в **обсуждении результатов**. В начале данной главы дается краткая информация о методе получения изучаемых соединений и указывается, что соединения были получены другими сотрудниками. Далее диссертант обсуждает результаты своих экспериментов. Была оценена растворимость соединений для проведения биологических испытаний, так чтобы концентрация органического солюбилизатора не являлась цитотоксичной. Затем была оценена цитотоксичность *in vitro* соединений Pt(II) с использованием стандартного МТТ-теста на панели злокачественных и нераковых клеточных линий. В качестве препарата сравнения был использован цисплатин. Проведен глубокий анализ полученных данных. Оценен цитотоксический потенциал соединений, их индекс селективности и выделено соединение-лидер. Затем были сформулированы выводы по структуре-активности, где показано влияние различных заместителей в органических лигандах комплексов. Все дальнейшие исследования, относящиеся к выяснению механизма действия, проводились с соединением-лидером. Было показано, что данное соединение обладает отличным от цисплатина механизмом клеточной гибели. Оно хуже индуцировало апоптоз, не воздействовало на клеточный цикл в контрольных точках, характерных для цисплатина, и индуцировало окислительный стресс в значительно большем объеме по сравнению с цисплатином. Все сделанные наблюдения позволили диссертанту предложить альтернативный механизм действия и новую

молекулярную мишень. В качестве альтернативного механизма клеточной гибели был рассмотрен ферроптоз. Значительный пласт исследований связан с оценкой клеточных маркеров, отвечающих на ферроптоз. На основе полученных данных диссертант предположил, что мишенью является глутатионовая система защиты клетки, а индукция гибели реализуется по механизму ферроптоза. Истощение пула восстановленного глутатиона (прямое или опосредованное) приводит к инактивации и последующей деградации GPX4, что в сочетании с сохранением экспрессии ACSL4 создает условия для запуска перекисного окисления липидов. Активация NRF2 отражает компенсаторный стресс-ответ, однако его недостаточно для предотвращения гибели. Для подтверждения глутатиона как основной мишени были проведены механистические эксперименты по оценке связывания комплекса платины с глутатионом, и было найдено быстрое связывание комплекса с глутатионом. Дополнительным доказательством ферроптоза и связывания с глутатионом послужили эксперименты по перекисному окислению липидов, экспрессии генов белков теплового шока и оценке морфологических изменений клеток. В результате этих экспериментов были сделаны выводы, что соединение-лидер вызывает выраженное перекисное окисление липидов мембран митохондрий, что согласуется с ферроптотическим профилем индукции клеточной смерти, а блокировка глутатиона и индукция ферроптоза приводит к выраженным морфологическим изменениям, снижению потенциала внутренней митохондриальной мембраны и повышенной экспрессии белков теплового шока. В последней части обсуждения результатов был предложен подход по переходу от соединения Pt(II) к пролекарственной форме Pt(IV), которая будет способна к восстановлению до активной формы в клеточной среде. Для полученного производного Pt(IV) была оценена цитотоксичность, и было найдено, что соединение проявляет активность в низком микромолярном диапазоне и значительно более активно, чем родительский комплекс Pt(II) или цисплатин. Затем были проведены исследования по доказательству механизма

действия клеточной гибели, схожие с описанными выше для соединения-лидера Pt(II). В результате анализа данных было показано, что пролекарство Pt(IV) сохранило механизм клеточной гибели через ферроптоз, но для данного соединения имеется и большой вклад апоптоза. Было показано восстановление Pt(IV) до Pt(II) глутатионом и последующая блокировка глутатиона Pt(II) и индуцирование ферроптоза. В качестве графического вывода приведена предположительная схема действия пролекарственного соединения.

В **экспериментальной части** приведены данные по используемым клеточным культурам, методам культивирования и используемым реагентам. Подробно приведены протоколы биологических экспериментов и реагенты, используемые в них. Также приведены методики синтеза лигандов и соединений платины и их характеристика комплексом физико-химических методов.

В разделе **закключение** сделаны обоснованные выводы и показаны перспективы развития данной работы. Список литературы содержит 143 наименования и оформлен по правилам. Приведен исчерпывающий список используемых сокращений.

Приведенные данные по выяснению механизма клеточной гибели и подтверждению молекулярной мишени серии циклоплатинированных комплексов Pt(II), а также переход от соединения Pt(II) к пролекарственной форме Pt(IV) и подтверждение ее механизма действия, однозначно свидетельствуют о **научной новизне** проведенного исследования, а также о **теоретической и практической** значимости полученных результатов. В целом диссертационное исследование характеризуется законченностью и внутренним единством, непротиворечивостью имеющихся литературных данных, полученных экспериментальных данных и выводов, сделанных на их основе.

Материалы исследования опубликованы в 3 научных статьях и апробированы на 12 российских и международных конференциях.

Диссертационное исследование Тохтуевой М. Д. удовлетворяет пунктам 1, 4, и 6 паспорта научной специальности 1.4.16 «Медицинская химия».

По работе можно сделать некоторые замечания и задать следующие вопросы:

1. В литературном обзоре, в разделе, посвящённом ферроптозу, целесообразно ссылаться на оригинальные исследовательские работы, а не на обзорную статью автора диссертации.
2. Чем обусловлена столь высокая точность указания финальной концентрации соединений в ряде экспериментов, а именно 48,6 мкМ? Требуется пояснение происхождения данной величины.
3. Поскольку соединение демонстрирует выраженное цитотоксическое действие, при изучении апоптоза желательно применять короткую инкубацию с более высокой концентрацией вещества. Кроме того, в 72-часовом эксперименте следовало бы зафиксировать более ранние временные точки. Также желательно было бы стандартизировать количество исследуемых клеток посредством разведения.
4. При анализе зависимости «структура–активность» автор отмечает положительное влияние разветвлённого алкильного фрагмента. Однако остаётся неясным, почему не были предприняты попытки синтеза соединений с более длинной или более разветвлённой цепью. Желательно было бы также количественно оценить липофильность полученных соединений.
5. При изучении взаимодействия с ДНК оценивалось влияние только на S-фазу клеточного цикла, хотя известно, что основной эффект цисплатина связывают с G2/M-фазой. Следовало бы проанализировать весь клеточный цикл целиком. Для более строгого доказательства отсутствия интеркаляции

корректнее было бы провести эксперименты по вытеснению известных интеркаляционных маркеров.

6. При первичной оценке уровня активных форм кислорода (АФК) желательно было бы продемонстрировать отсутствие прооксидантного эффекта самого лиганда.

7. В ЯМР-экспериментах с глутатионом указанные временные параметры с заявленной точностью лишены смысла, поскольку регистрация спектров занимает несколько минут и не является мгновенной. Кроме того, биологическая релевантность данного исследования вызывает сомнения, так как оно проводилось в органических растворителях. Подтверждение образования аддукта следовало бы получить методом масс-спектрометрии.

8. Полученные производные Pt(IV), несомненно, являются пролекарствами, поэтому крайне желательно оценить кинетику восстановления Pt(IV) до Pt(II) под действием низкомолекулярных клеточных восстановителей, таких как глутатион и аскорбат.

9. В экспериментальной части приведены методики синтеза известных соединений с их характеристикой, а также новых производных Pt(IV). Представляется некорректным включать в диссертацию описание синтезов, которые автор лично не выполнял.

Тем не менее, высказанные замечания не снижают общую высокую оценку диссертационной работы Тохтуевой М. Д.

В целом можно констатировать, что диссертационная работа Тохтуевой Марии Дмитриевны выполнена на высоком научном уровне, а ее результаты имеет важное практическое значение для развития понимания механизма действия противоопухолевых соединений платины.

Заключение

На основании вышеизложенного можно заключить, что диссертационная работа Тохтуевой Марии Дмитриевны «Исследование противоопухолевой активности циклоплатинированных соединений и оценка их роли в запуске программируемой клеточной гибели в злокачественно перерожденных клетках» является самостоятельным, завершенным исследованием, в котором содержится решение научной задачи, имеющей важное значение для развития химии соединений металлов с цитотоксической активностью.

Диссертационная работа Тохтуевой Марии Дмитриевны соответствует критериям пунктов 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842 (в действующей редакции), а ее автор, Тохтуева Мария Дмитриевна, **заслуживает** присуждение ученой степени кандидата химических наук по научной специальности **1.4.16 – Медицинская химия**.

Официальный оппонент

Доцент кафедры Медицинской химии и тонкого органического синтеза
Химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова,
кандидат химических наук по специальности

02.00.03 – Органическая химия

Назаров Алексей Анатольевич

08.10.2026 г.

Почтовый адрес: 119991, Москва, ГСП-1

Ленинские горы д.1 стр.3, МГУ имени М.В. Ломоносова

e-mail: nazarova@my.msu.ru

тел. +7(910)4143545

И.О. декана химического факультета

МГУ имени М.В. Ломоносова, профессор



Карлов С. С.