

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертацию Тохтуевой Марии Дмитриевны

“Исследование противоопухолевой активности циклоплатинированных соединений и оценка их роли в запуске программируемой клеточной гибели в злокачественно перерожденных клетках”,

представленной на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.16. Медицинская химия

Диссертационная работа Тохтуевой М.Д., выполненная в научно-образовательном и инновационном центре химико-фармацевтических технологий Химико-технологического института ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина», посвящена получению новых комплексов платины(II) и платины(IV) на основе лигандов 6-арил-2,2'-бипиридинового ряда, оценке их цитотоксичности и установлению механизма противоопухолевой активности соединений-лидеров. Диссертация является тщательно спланированным обширным и цельным исследованием, направленным на скрининг соединений-лидеров, высокотоксичных в отношении опухолевых клеток, идентификацию важнейших биологических мишеней и установление механизма цитотоксического действия, и представляет собой законченную научно-квалификационную работу.

Цель работы заключается в изучении противоопухолевых свойств серии комплексов платины(II) арилбипиридинов, определении механизма индукции клеточной гибели и модификации структуры соединения-лидера. В число поставленных задач входят первичный скрининг цитотоксической активности, направленный на выбор соединения-лидера из группы комплексов платины(II), идентификация биологических мишеней и установление основного механизма действия соединения-лидера, а также оценка цитотоксической активности и изучение механизма действия соответствующего комплекса платины(IV).

Исследование Тохтуевой М.Д. находится в русле актуального направления медицинской химии, связанного с созданием эффективных противоопухолевых агентов, обладающих высокой избирательностью действия, минимальными побочными эффектами и низким риском развития резистентности. Комплексы на основе платины (цисплатин, карбоплатин и другие) хорошо зарекомендовали себя в качестве противоопухолевых препаратов первой линии, действие которых связано преимущественно с нарушением репликации и транскрипции ДНК и запуском апоптоза. Однако важными недостатками существующих препаратов платины является высокая токсичность в отношении здоровых пролиферирующих клеток, а также высокий риск развития лекарственной резистентности. В связи с этим **высоко актуальной** является разработка новых препаратов платины,

проявляющих высокую активность в отношении опухолевых клеток (за счет индукции апоптоза и альтернативных механизмов), но обладающих высокой избирательностью действия и преодолевающих существующие механизмы лекарственной устойчивости. Скринингу новых эффективных и селективных цитостатических агентов из группы платинаорганических соединений и изучению механизма их действия на опухолевые клетки посвящена диссертационная работа Тохтуевой М.Д.

Научная новизна исследования не вызывает сомнений. Впервые была обнаружена селективная цитотоксичность хлорплатиновых комплексов 6-арил-2,2'-бипиридина в отношении клеток глиобластомы человека. Соединения данной группы ранее не рассматривались в качестве потенциальных антинеопластических агентов. Систематическое изучение биологических маркеров позволило сделать выводы о неапоптотическом механизме цитотоксической активности комплексов платины(II). Впервые были получены свидетельства того, что комплекс на основе платины(II) посредством влияния на систему обмена глутатиона запускает механизмы окислительного стресса и индукцию клеточной гибели по механизму ферроптоза. На основе соединения-лидера, представляющего собой производное двухвалентной платины, впервые синтезирован комплекс платины(IV), превосходящий по цитотоксической активности родоначальное соединение, и показан комбинированный механизм его действия, связанный с индукцией апоптоза и ферроптоза.

Создание научных основ для разработки препаратов платины для борьбы со злокачественными новообразованиями, отличающихся оригинальным механизмом действия при отсутствии механизмов резистентности опухолевых клеток, придает работе несомненную **теоретическую значимость**.

Реализованный в работе комплексный подход, предусматривающий первичный скрининг соединения-лидера среди небольшой библиотеки хлорплатиновых комплексов 6-арил-2,2'-бипиридинов, идентификацию основной внутриклеточной мишени его действия, получение его структурного аналога на основе платины(IV), оценку степени и механизма его цитотоксической активности. Относительная простота и надежность методов получения комплексов платины(II) и платины(IV), обладающих высокой цитотоксичностью в отношении клеток глиобластомы человека, и использование комплекса доступных и легко воспроизводимых химических и биохимических методов для идентификации механизма цитотоксического действия позволяют судить о высокой **практической значимости** исследования.

Несомненно, **перспективной** является дальнейшая разработка темы исследования, связанная с проведением экспериментов на лабораторных животных, оптимизацией структуры соединений-лидеров и выбором оптимальных режимов дозирования.

Достоверность полученных результатов, **обоснованность** научных положений, выводов и заключения обеспечены использованием комплекса современных синтетических, физико-химических, цитологических и иммунохимических методов. Для оценки строения исследуемых соединений и механизма их взаимодействия с глутатионом активно использована спектроскопия ЯМР ^1H , ^{13}C и ^{195}Pt , включая гетероядерные корреляционные эксперименты. Для первичного скрининга цитотоксичности использован МТТ-тест. Флуоресцентное окрашивание с последующей микроскопией во флуоресцентном режиме, использованное в работе, лежит в основе стандартных методик оценки индукции апоптоза и процессов окислительного стресса. Использование в работе таких методов, как вестерн-блоттинг и полимеразная цепная реакция, для верификации механизма цитотоксического действия свидетельствуют о высоком уровне компетенций автора в области современных биохимических методов исследования. Публикация результатов работы в рецензируемых научных изданиях и активное участие Тохтуевой М.Д. в международных и российских конференциях по химической и медицинской тематике подчеркивают актуальность темы и свидетельствуют о значительном **личном вкладе** автора в работу.

Диссертационная работа и автореферат диссертации оформлены в соответствии с ГОСТ Р 7.0.11-2011 «Диссертация и автореферат диссертации. Правила оформления» и требованиями Высшей аттестационной комиссии Российской Федерации. Диссертация изложена на 141 странице и содержит Введение, три главы (аналитический обзор литературы, обсуждение результатов и экспериментальная часть), заключение, список литературных источников, содержащий ссылки на 143 литературных источника, и список используемых сокращений.

Во Введении обоснована актуальность темы исследования, обозначены цель, задачи и объекты исследования, положения, выносимые на защиту. Сформулированы научная новизна, практическая значимость работы; представлены общие сведения об использованных в работе методах и достоверности полученных результатов. Приведены краткие сведения о публикациях и апробации результатов работы.

В Литературном обзоре, изложенном на 26 страницах и включающем 89 библиографических ссылок, систематизирована информация о существующих противоопухолевых агентах группы соединений платины, их механизме действия, побочных эффектах и механизмах лекарственной устойчивости клеток злокачественных

новообразований. В обзоре представлена краткая характеристика различных механизмов клеточной гибели и сделан акцент на индукции клеточной гибели путем апоптоза как основном механизме действия известных соединений платины. Хорошее знакомство с литературой по теме исследования позволило автору представить лаконичный и, вместе с тем, исчерпывающий анализ механизмов клеточной гибели, обозначить ключевые мишени, воздействие на которые способно запустить гибель клеток. Анализ литературных данных позволил автору сделать вывод о том, что использование большинства известных препаратов платины, индуцирующих гибель клеток по пути апоптоза, сталкивается с проблемами возникновения побочных эффектов и лекарственной устойчивости, и подчеркнуть актуальность поиска агентов, способных запускать неапоптотические пути гибели клеток злокачественных новообразований, преодолевая таким образом проблему резистентности.

Глава 2 содержит обсуждение полученных в работе результатов. Представлены краткие сведения о химическом синтезе библиотеки хлорплатиновых комплексов 6-арил-2,2'-бипиридинов для первичного скрининга цитотоксичности. На основании результатов МТТ-теста сделаны выводы о взаимосвязи структуры и цитотоксичности и выбрано соединение-лидер для углубленного тестирования.

Комплексная оценка биохимических маркеров в опытах с соединением-лидером и референсными соединениями (цисплатином и эрастином) позволила достоверно судить о механизме клеточной гибели под действием предложенного в работе комплекса платины(II). Получены убедительные свидетельства запуска клеточной гибели не по пути апоптоза (как в случае препарата сравнения цисплатина), а по пути ферроптоза (индукции окислительного стресса). Снижение уровня глутатионпероксидазы 4 (GPX4) наряду с активацией редокс-чувствительного транскрипционного фактора (NRF2) под действием соединения-лидера свидетельствует о накоплении активных форм кислорода и запуске клеточной гибели по механизму, связанному с окислительным стрессом.

Анализ экспрессии генов белков теплового шока в клетках глиобластомы человека A172 с помощью полимеразной цепной реакции, оценка морфологических изменений клеток, а также оценка изменения потенциала внутренней мембраны митохондрий под действием комплекса платины(II) свидетельствовали о реализации процесса клеточной гибели по пути ферроптоза.

Эксперименты по мониторингу взаимодействия хлорплатинового комплекса 6-изооктилокси-2,2'-бипиридина с глутатионом с помощью спектроскопии ЯМР можно рассматривать как модельные, иллюстрирующие высокую реакционную способность соединения-лидера по отношению к эндогенным тиолам. Полученные в работе данные

указывают на то, что истощение внутриклеточного пула глутатиона под действием соединения-лидера является важным звеном в механизме клеточной гибели, однако для доказательства избирательного прямого химического взаимодействия комплекса платины(II) с глутатионом, по-видимому, требуются дополнительные эксперименты.

Промежуточный вывод о механизме цитотоксического действия комплекса на основе платины(II), связанном с нарушением внутриклеточной глутатион-зависимой антиоксидантной системы, является значимым наблюдением, открывающим путь к новой группе противоопухолевых препаратов платины с неапоптотическим механизмом действия.

Самостоятельная часть работы связана с получением потенциального пролекарства на основе соединения-лидера путем окисления платины(II) до платины(IV). Автором предложен простой и эффективный способ синтеза 6-арил-2,2'-бипиридиновых комплексов платины(IV), доказано их строение. Продемонстрировано, что изменение степени окисления платины приводит к существенному усилению цитотоксического действия в отношении клеток глиобластомы при сохранении высокой селективности (индекс селективной цитотоксичности около 10,8). Анализ биохимических маркеров (NRF2, GPX4, поли-(АДФ-рибоза)-полимеразы 1 и других) позволил автору сделать заключение о комбинированном механизме цитотоксической активности комплекса платины(IV) и индукцию как апоптоза, так и ферроптоза в качестве механизма клеточной гибели.

Таким образом, в результате систематической работы по синтезу новых платинаорганических соединений, сравнительной оценке их цитотоксической активности в отношении опухолевых и условно-нормальных клеток человека, определению ключевых биологических мишеней автору удалось предложить первый-в-классе индуктор ферроптоза на основе платины(II), высокотоксичный в отношении клеток глиобластомы, и его аналог на основе платины(IV), отличающийся комбинированным механизмом цитотоксичности и существенно превосходящий по активности препарат сравнения цисплатин.

Экспериментальная часть, выделенная в Главу 3, содержит описание методик синтеза новых соединений и их физико-химических свойств, детальное описание экспериментов, связанных с культивированием и изучением клеток, опытов по идентификации биомишеней и механизмов клеточной гибели. Методики синтеза новых соединений изложены кратко, со ссылкой на оригинальные работы автора работы (в составе коллектива авторов); подробно представлены физико-химические свойства 6-арил-2,2'-бипиридиновых лигандов и соответствующих хлорплатиновых комплексов. В

работе использован ряд современных биохимических методов: вестерн-блоттинг, полимеразная цепная реакция, тесты, основанные на флуоресцентном окрашивании клеток и др. Для оценки строения и реакционной способности полученных соединений использованы современные методы физико-химического анализа: спектроскопия ЯМР ^1H , ^{13}C и ^{195}Pt , ИК спектроскопия, элементный анализ, рентгеноструктурный анализ. Строение соединений, полученных в работе впервые, в целом надежно доказано. Результаты опытов с использованием клеточных культур не вызывают сомнений, тщательность выполнения экспериментов свидетельствует о существенном опыте и профессионализме автора.

Выводы работы, сформулированные в Заключение, позволяют судить о решении поставленных задач и достижении цели работы, связанной с изучением цитотоксической активности и механизма действия хлорплатиновых комплексов 6-арил-2,2'-бипиридинов и трансформацией соединения-лидера в комплекс платины(IV), обладающий улучшенным профилем биологической активности. Автореферат в полной мере отражает содержание диссертации.

В целом, экспериментальные данные, представленные в работе, являются **новыми**. Исследование выполнено на высоком научном уровне, правильность интерпретации полученных результатов не вызывает сомнений. Выводы хорошо аргументированы и надежно подкреплены содержанием работы. Текст диссертационной работы и автореферата написан грамотным научным языком, содержит незначительное количество орфографических, пунктуационных и стилистических ошибок.

При знакомстве с диссертацией и авторефератом возник ряд вопросов:

1. Зависит ли концентрация восстановленного глутатиона и экспрессия глутатионпероксидазы 4 от состава культуральной среды и особенностей посева клеток глиобластомы человека (A172)? Могли ли полученные свидетельства в пользу реализации пути клеточной гибели по механизму ферроптоза, быть связаны с особенностями клеточной линии A172 или условий культивирования?
2. Можно ли рассматривать ферменты, содержащие сульфгидрильные группы в активном центре (глутатионредуктазу, глицеральдегид-3-фосфатредуктазу и др.), в качестве потенциальных внутриклеточных мишеней действия комплексов платины(II)?
3. Каков предполагаемый механизм окисления платины(II) в комплексах **2.2b,e** до платины(IV) в комплексах **2.3a,b**?
4. Может ли постулируемый в работе продукт взаимодействия хлорплатинового комплекса **2.2e** с глутатионом быть выделен и охарактеризован (например, с помощью масс-спектрометрии)? Происходит ли взаимодействие восстановленного глутатиона с цисплатином в условиях, аналогичных таковым для реакции с соединением **2.2e**?

Замечания по работе:

1. Словосочетание «циклоплатинированные соединения», содержащееся в названии диссертации, является весьма общим и не вполне конкретно отражает объект исследования, а именно хлорплатиновые комплексы 6-арил-2,2'-бипиридинов.
2. В диссертации и автореферате не сформулирован личный вклад автора в работу.
3. Пункт 5 Заключение, констатирующий индукцию ферроптоза в качестве механизма действия комплекса платины(IV), находится в противоречии с Обсуждением результатов, где убедительно показано, что наряду с ферроптозом комплекс платины(IV) обеспечивает реализацию апоптотического пути клеточной гибели.
4. Ряд комплексов платины(II) и платины(IV), представленных в настоящей работе, не являются новыми, их описанные ранее синтез и фотофизические свойства [*Inorg. Chem.* **2009**, 48, 2407-2419; *J. Organomet. Chem.* **2009**, 694, 2750-2756; *Inorg. Chem.* **2023**, 62, 1306-1322] заслуживали, по крайней мере, упоминания в тексте настоящей работы.
5. Гипотеза о том, что наличие липофильного алкильного заместителя в структуре комплекса способствует его проникновению в клетку, не подкреплена прямыми доказательствами накопления соединений **2.1e** и **2.2e** внутри клеток. Представленные в работе результаты МТТ теста (с. 45) указывают лишь на роль платины как ключевого элемента в структуре, ответственного за цитотоксичность.
6. Стабильность комплекса **2.2e** в растворе ДМСО-*d*₆ не является строгим доказательством его стабильности в физиологических условиях (с. 45 диссертации, с. 11 автореферата).
7. В тексте диссертации (в разделе Обсуждение результатов) и автореферата отсутствуют указания на методы вестерн-блоттинга и полимеразной цепной реакции, использованные для идентификации биоматериала и анализа механизма действия соединения-лидера **2.2e**, в то время как в Экспериментальной части применение данных методов описано подробно.
8. Имеет место дублирование информации о цитотоксичности соединений, распределении клеток, находящихся на различных этапах апоптоза, доле клеток в стадии активной репликации ДНК и других биохимических индикаторах в таблицах и графиках (диаграммах).
9. При анализе взаимодействия хлорплатиновых комплексов с глутатионом с помощью спектроскопии ЯМР ¹H было бы полезно сравнить спектры реакционных смесей не только со спектром восстановленного глутатиона, но и его окисленной формы (дисульфида). Неясно различие между структурами «интермедиата» и «продукта», которые обсуждаются в разделе 2.1.3.2 диссертации.

10. Методики синтеза соединений **2.2e-h**, изложенные в статье [91], входящей в состав публикаций автора по теме диссертационного исследования, следовало бы подробно представить в Экспериментальной части диссертации.

Имеется ряд незначительных замечаний по работе:

1. Литературный обзор:

- Неудачные выражения: «платиносодержащая химиотерапия» (с. 12), «высоко-перспективная платформа» (с. 20), «гибель клеток, вызванная моноплатиной» (с. 30).
- Структура комплекса платины **1.3** на рис. 1.10 не соответствует структуре, представленной в оригинальной работе (ссылка [79] в диссертации) (с. 31).

2. Обсуждение результатов:

- Описание условий алкилирования – «кипячение в ацетонитриле при 120 °С» (с. 36) – требует уточнений (ацетонитрил кипит при атмосферном давлении при 82 °С).
- На схемах 2.1 и 2.2 диссертации (схемы 1 и 2 автореферата) указаны общие значения выхода реакций, в то время как выход может существенно различаться в зависимости от строения заместителей в молекулах реагентов. Схема 2.2 частично дублирует схему 2.1 (с. 79 и 37 диссертации) (схемы 2 и 1, с. 18 и 8 в автореферате соответственно).
- Описание противоопухолевой активности соединений **2.2e** (с. 40) и **2.2h** (с. 39) («IC₅₀ < 8,2 мкмоль/л» и «IC₅₀ < 33 мкмоль/л» соответственно) не согласуется с информацией в таблице 2.2 (с. 38) («IC₅₀ 8,2±1,5» и «IC₅₀ 33,0±4,1» соответственно).
- В разделе 2.1.2.3 сказано о «более детальном изучении механизмов противоопухолевого действия исследуемых соединений» (с. 53 диссертации), в то время как исследуется единственный комплекс **2.2e**.
- В тексте диссертации (с. 66) и автореферата (с. 14) отмечено, что окисление кардиолипина в митохондриях происходит под действием самого комплекса **2.2e**, в то время как из общей логики повествования следует, что соединения **2.2e** лишь индуцирует процесс накопления активных форм кислорода, ответственных за окислительные процессы.
- Рисунок 2.23 (с. 77 диссертации) частично дублирует рисунок 2.10 (с. 54 диссертации).
- Данные об изменении экспрессии маркера ферроптоза ASCL4 под действием эрастина, представленные в таблицах 2.7 и 2.14 (с. 55 и 82 диссертации), существенно различаются.
- Встречаются неудачные выражения, например, «100% раствор диметилсульфоксида» (с. 37), «Н-; СН₃-заместители <...> остаются неактивными» (с. 44), «фенил снижает лиофильные свойства» (с. 44), «хоть и невесомый, но вклад заместителя в активность» (с. 46).

3. Экспериментальная часть:

- Неясно, что подразумевается под «обработкой реагентов и расходных материалов» антисептиком (с. 94 диссертации).
- Отсутствует указание на происхождение эрастина и цисплатина, использовавшихся в качестве препаратов сравнения.
- Не указаны концентрации рабочих растворов аннексина V-FITC и иодида пропидия (с. 98 диссертации).
- Не указано соотношение компонентов разделяющего геля для вестерн-блоттинга; не указаны вид и количество соединения меди для проведения биуретовой реакции (с. 107 диссертации).
- Не указан стандарт химического сдвига для спектроскопии ЯМР ^{195}Pt .

Перечисленные замечания и недочеты носят дискуссионный характер и не снижают общего положительного впечатления от работы.

Результаты рассматриваемой диссертационной работы могут быть полезны для химиков-органиков, работающих в отечественных научных учреждениях: Институт органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН (г. Екатеринбург), Уральский федеральный университет им. первого Президента России Б.Н. Ельцина (г. Екатеринбург), Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова РАН (г. Новосибирск), Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова (г. Москва), Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН (г. Москва), Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН (г. Москва), Институт проблем химической физики и медицинской химии РАН (г. Черноголовка), Волгоградский государственный медицинский университет (г. Волгоград), Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова (г. Казань), Северо-Кавказский федеральный университет (г. Ставрополь) и др.

Автореферат и опубликованные в научной печати работы Тохтуевой М.Д. (15 публикаций, включающих 3 статьи в рецензируемых научных изданиях, а также тезисы и материалы научных конференций) **полностью и правильно отражают содержание диссертационной работы.** Результаты работы, представленной к защите, прошли достаточную апробацию.

Диссертационная работа Тохтуевой М.Д. охватывает области исследований, соответствующие паспорту специальности 1.4.16. Медицинская химия в части пп. 1б. поиск, структурный дизайн и синтез соединений-лидеров – потенциальных физиологически активных (лекарственных) веществ, на основе: анализа и модификации структур известных активных соединений; 3. оптимизация структуры соединения-лидера с целью повышения его активности и селективности; 6. биологическое и физиологическое

тестирование сконструированных и синтезированных соединений на предмет изучения особенностей их взаимодействия с молекулярными мишенями организма.

В диссертации изложены новые научно обоснованные технические решения и разработки, имеющие существенное значение для развития отечественной химической науки и здоровьесбережения. По актуальности, объему выполненной работы, теоретической и практической значимости, достоверности результатов, обоснованности научных положений и выводов диссертационная работа Тохтуевой Марии Дмитриевны соответствует критериям пунктов 9-14 «Положения о порядке присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 (в действующей редакции), а ее автор, **Тохтуева Мария Дмитриевна**, заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по научной специальности 1.4.16. Медицинская химия.

Официальный оппонент,
Ведущий научный сотрудник
Лаборатории медицинской химии
Института органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН,
Доктор химических наук,

08.10.2026 г.



Дмитрий Андреевич Груздев

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт органического синтеза им. И.Я. Постовского Уральского отделения Российской академии наук

620066, г. Екатеринбург, ул. Софьи Ковалевской, 22/20

телефон: +7(343) 374-35-43

e-mail: gruzdev-da@ios.uran.ru

Подпись Груздева Д.А. удостоверяю
Ученый секретарь ИОС УрО РАН, к.т.н.



Красникова О.В.