

**ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени
кандидата химических наук Ипатовой Дарьи Андреевны
на тему: «Избирательная цитотоксичность и особенности действия
в опухолевых клетках производных пиразолкарбоксамидов, хроман-4-
она, 1,4-нафтохинона, пирроло[1,2*a*]хиноксалина и фотоактивируемых
соединений платины»
по специальности 1.4.9. Биоорганическая химия**

Актуальность темы диссертации

Онкологические заболевания представляют собой огромную и гетерогенную группу заболеваний, которые представляют угрозу жизни и здоровью людей. По данным исследований GLOBACAN, в год в мире регистрируется около 20 млн случаев рака и смерть более 9,5 млн. человек от него. Распространенность рака общепонятна: с ним сталкиваются многие семьи. В последние десятилетия достигнут значительный прогресс в терапии многих видов рака, включая лимфомы, миелому, меланому, рак простаты. Однако терапия других видов рака остается малоэффективной: низкая выживаемость остается для пациентов с раком желудка, глиомами, опухолями поджелудочной железы и печени. Кроме того, даже для нозологий с общим неплохим прогнозом (напр., рак груди) имеются варианты с неблагоприятным течением болезни (напр., трижды-негативный рак молочной железы) и случаи позднего выявления даже «благоприятных» вариантов. Для них терапия также малоэффективна. Поэтому остается крайне актуальной проблема разработки новых подходов терапии многих видов рака, поиск новых мишеней для таргетной терапии, а также создание более эффективных и щадящих препаратов является крайне актуальной. И представленная диссертация представляет собой исследование, в котором разрабатываются такие потенциальные противораковые препараты.

Краткая характеристика основного содержания диссертации

Диссертационная работа написана по традиционной схеме и состоит из введения, глав «Обзор литературы», «Материалы и методы» и «Результаты и

обсуждение», Заключение, Списка литературы и Приложения. Работа изложена на 152 страницах, иллюстрирована 30 рисунками и 15 таблицами, а список литературы содержит 189 источников.

В разделе «Введение» кратко обсуждаются актуальность и степень разработанности темы исследования, формулируются цели и задачи работы, обсуждаются научная новизна, практическая значимость и методология исследования, перечисляются основные положения, выносимые на защиту, обоснованы степень их достоверности и личный вклад автора, а также приводится список публикаций по теме диссертации и список конференций, на которых проведена апробация работы.

В Литературном обзоре диссертант рассказывает о стратегиях создания противоопухолевых лекарственных препаратов (перепрофилирование имеющихся препаратов, скрининг библиотек, рациональный дизайн), обсуждает модели для проведения фенотипического скрининга (и рассматривает в т.ч. со-культивирование клеток), а также анализирует противораковую активность соединений, близких по структуре к изучаемым в диссертации, а также их механизм(ы) действия.

Раздел «Материалы и методы» описывает методики работы с клеточными культурами, скрининга веществ, различные варианты оценки цитотоксичности, клеточной гибели и возможных механизмов действия веществ (интеркаляция, ингибирование биосинтеза ДНК, продукция активных форм кислорода, ингибирование полимеризации тубулина. Раздел неплохо написан, методики позволяют независимому исследователю воспроизвести все результаты автора. Особым достоинством раздела является упоминание таких обязательных, но редко проводимых действий при работе с клеточными линиями как STR-профилирование и анализ возможного заражения культур микоплазмой.

В главе «Результаты и обсуждение» автор излагает последовательность исследований. Он начинает с описания и демонстрации системы высокопроизводительного поиска с использованием флуоресцентных сокультур клеточных линий. Этот поиск позволяет одновременно анализировать

токсичность в отношении раковых и нераковых линий с определением величины индекса селективности. Далее он сообщает об идентификации пяти типов соединений с заметной селективностью в отношении раковых клеток и посвящает каждому из них отдельный подраздел. В каждом подразделе проводится детальный анализ зависимости активности веществ от их структуры, определяется механизм действия веществ и, в случае наиболее перспективных соединений, валидируется их противораковая активность в моделях *in vivo*.

Первый подраздел обсуждает производные пиролкарбоксамиды, которые вызывают гибель клеток рака легкого и рака молочной железы. Наиболее активное вещество этой серии проявляет активность в субмикромольных концентрациях. Автор анализирует его активность в отношении 11 культур раковых и двух нераковых линий клеток. *In vivo* это вещество также подавляет рост опухолевых клеток и не вызывает заметных токсических эффектов, однако уступает по эффективности препарату сравнения (таксол). Второй подраздел исследует производные хроман-4-она в отношении клеток рака молочной железы. Эта группа соединений представлена сравнительно умеренно и малоактивными веществами с невысокой селективностью в отношении, а два наиболее активных действуют в микромольных концентрациях, останавливая клеточный цикл и вызывая апоптоз. Третья группа веществ образована производными 1,4-нафтохинона, активность которых в отношении клеток рака легкого и рака молочной железы проявляется уже в концентрациях в районе десятков мкМ. Эти вещества не оказывают заметного эффекта на клеточный цикл, но вызывают поздний апоптоз/некроз. Автор демонстрирует, что эти вещества вызывают деполяризацию митохондрий и стресс эндоплазматического ретикулума с ответом на несвернутые белки, а одно из них также способно выступать в качестве интеркалятора, блокируя репликацию ДНК. Наиболее активное вещество проявило способность замедлять рост опухолей у мышей. Четвертую группу соединений образовывали производные пирроло[1,2 α]хиноксалина. Эти вещества также проявляли активность в наномольных концентрациях, и их активность коррелировала с

пролиферативной активностью клеток. Диссертант продемонстрировал, что эти вещества блокируют полимеризацию тубулина. В системе *in vivo* было продемонстрировано, что одно из веществ эффективно подавляет рост как привитых опухолей, так и перевиваемого лейкоза. Наконец, пятая группа соединений была представлена фотоактивируемыми веществами на основе тетраацетилрибофлавина. Аддукт этого лиганда с соединениями платины проявлял цитотоксичность при фотоактивации, останавливая клеточный цикл и разрушая цитоскелет.

Наконец, в разделе «Заключение» кратко суммированы основные результаты диссертационной работы.

Степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов и практических рекомендаций, сформулированных в диссертации.

Все результаты исследования, представленные в диссертации выводы и вынесенные на защиту положения являются полностью обоснованными. Они подтверждены многочисленными экспериментальными данными, изложенными на рисунках и таблицах основной части диссертации и в Приложении. Методы исследования точно соответствуют задачам работы. Все ключевые результаты были опубликованы в 7 научных статьях в профильных рецензируемых журналах (в т.ч. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, *ChemMedChem*, *ACS Applied Materials & Interfaces* и *ACS Pharmacology & Translational Science*) и доложены на различных профильных научных конференциях. Стоит отметить, что в двух публикациях диссертант является первым автором, что говорит о его определяющем вкладе в исследование.

Научная новизна и практическая значимость работы

Дарьей Андреевной Ипатовой охарактеризованы новые вещества с противораковой активностью и значительной селективностью действия. Ею исследован механизм действия наиболее перспективных соединений и подтверждено их противораковое действие в моделях *in vivo*. Таким образом, автор предложила новые кандидатные противораковые препараты. Наиболее

активные вещества могут пройти в будущем доклинические исследования для их трансляции в клиническую практику.

Замечания по диссертационной работе

Несмотря на четкость работы, значимые научные результаты и качество оформления, к диссертационной работе можно отметить ряд недостатков и технических замечаний, касающихся ряда разделов Экспериментальной части и представления результатов.

1. Основной метод оценки цитотоксического действия веществ основан на использовании красителя МТТ, который превращается оксидоредуктазами живых клеток в формазан. Скорость его конверсии зависит и от метаболической активности клеток, что делает актуальной верификацию ключевых результатов и другими методами. При этом стоит отметить, что представленные результаты цитометрии частично отвечают на поставленный вопрос.

2. Противораковые вещества могут а) замедлять скорость или б) блокировать рост клеток и б) вызывать их гибель. На ряде графиков (напр., Рисунок 43) можно видеть, что сохраняется некоторое количество жизнеспособных клеток. Разграничить между цитостатическим и цитотоксическим действием можно, добавив в эксперимент измерение плотности клеток на момент добавления веществ для расчета а) прироста и б) убыли их количества при обработке веществом.

3. Разделы 3.4.3.2 и 3.4.3.3 следовало бы расширить. Так, первый из них говорит о том, что по данным транскриптомного анализа вещества 45 и 49 вызывают усиление экспрессии генов ответа на несвернутые белки, однако данные не приводит. Во втором для верификации диссертант анализирует уровни транскрипции генов *Xbp1(s)* и *ATF4*, а также уровни фосфорилирования фактора инициации трансляции *eIF2 α* . Стоит отметить, что активация фактора и повышение уровня экспрессии *ATF4* может происходить и в ответ на другие стимулы, включая окислительный стресс, вирусные инфекции и нарушение клеточного метаболизма. Более того, в этих случаях наиболее часто регистрируют повышение трансляции мРНК *ATF4*, а не повышение уровня

самой мРНК (хотя такое тоже описано в литературе). Диссертанту следовало бы расширить спектр генов для анализа всех трех ветвей ответа на несвернутые белки, а также привести последовательности используемых праймеров в экспериментальной части.

4. При анализе селективности действия в отношении раковых и нераковых линий клеток стоит отметить, что нераковые линии (напр., MCF10A) культивировались в заметно иных условиях, чем раковые.

5. Таблица 10: возможно, в цифры индексов селективности ряда веществ закрались опечатки).

6. В подразделе 3.4.3.6 (Индукция окислительного стресса) правильнее было бы еще раз проговорить, как меряли продукцию АФК. И на мой взгляд нельзя ставить знак равенства между окислительным стрессом (заголовок) и уровнем продукции АФК (измеряемый параметр).

7. Разделы Экспериментальной части, посвященные цитометрии, следовало бы дополнить данными о длинах волн лазеров и детекторов. В подразделе 2.6 вызывает удивление высокая концентрация иодида пропидия (0,1 г/л), а в подразделе 2.9 – пероксида водорода (0,3%). Не очень коррелируют между собой данные о количестве клеток, которые сажали в различные планшеты ($3\text{--}5 \cdot 10^3$ на ячейку 96-луночного планшета и $3 \cdot 10^6$ на ячейку 6-луночного). Наверное, стоит перепроверить эти цифры для исключения опечаток.

8. В диссертации отсутствует описание методов статистики при анализе результатов и данные о достоверности различий на графиках (например, при обсчете данных анализа клеточного цикла).

Вместе с тем, указанные замечания и вопросы являются техническими и касаются продолжения данного направления исследований. Как следствие, не умаляют высокой значимости диссертационного исследования.

Заключение: Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности

1.4.9. Биоорганическая химия (по химическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова. Диссертационное исследование оформлено согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Таким образом, Ипатова Дарья Андреевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.9. Биоорганическая химия.

Официальный оппонент:

Доктор биологических наук,
заведующий лабораторией биохимии вирусных инфекций
ФГБУН Институт молекулярной биологии
им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук

Иванов Александр Владимирович

11 июня 2026 г

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена
диссертация: 03.01.03. Молекулярная биология

Адрес места работы: 119991, г. Москва, ул. Вавилова, 32

ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта
Российской академии наук, лаборатория биохимии вирусных инфекций

Тел. +7-499-135-2311; e.mail: aivanov@eimb.ru

Подпись сотрудника Института молекулярной биологии им. В.А.
Энгельгардта д.б.н. Иванова А.В заверяю:

Заместитель директора ИМБ РАН

Чл.-корр. РАН, д.б.н.

Митькевич Владимир Александрович

дата