

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора химических наук Егоровой Ксении Сергеевны

На диссертационную работу Любиной Анны Павловны на тему
«Биохимические аспекты механизмов цитотоксического и антимикробного
действия новых производных фосфониевых солей», представленной к
официальной защите на соискание ученой степени кандидата биологических
наук по научной специальности 1.5.4. Биохимия (биологические науки).

Актуальность темы выполненной работы

Фундаментальной проблемой современной медицинской химии и биохимии остается фрагментарность знаний о молекулярных механизмах, посредством которых потенциальные терапевтические агенты реализуют свою биологическую активность. Особенно остро это ощущается в отношении соединений, претендующих на роль средств двойного действия — одновременно цитотоксических и антимикробных. Без детального понимания того, какие именно сигнальные каскады активируются или подавляются в клетке-мишени, невозможно ни объяснить наблюдаемую избирательность действия, ни прогнозировать возможные побочные эффекты, ни целенаправленно оптимизировать структуру соединения. Диссертационная работа Любиной А.П. нацелена на восполнение этого пробела применительно к новому классу фосфониевых солей, содержащих фенольный фрагмент, для которых ранее были известны лишь отдельные проявления биологической активности, но не механизм их воздействия на клетки.

Следует отметить, что соискатель поставил перед собой методологически сложную задачу — провести сравнительный анализ молекулярно-биологических механизмов, запускаемых одними и теми же соединениями в двух принципиально различных типах живых клеток: эукариотических (опухолевых) и прокариотических (бактериальных). Такой подход представляет фундаментальный интерес, поскольку позволяет выявить, с одной стороны, универсальные закономерности взаимодействия липофильных катионов с биологическими мембранами, а с другой — специфические для каждого типа

клеток внутриклеточные события, определяющие исход этого взаимодействия. Работа на стыке механизмов апоптоза, биоэнергетики митохондрий и редокс-регуляции с одной стороны и микробного стресс-ответа и мембранного транспорта с другой является, безусловно, актуальной и востребованной.

Научная новизна исследования и теоретическая значимость работы

Научная новизна диссертационного исследования определяется в первую очередь тем, что соискатель изучил цепь молекулярно-биологических событий, ведущих от первичного контакта фосфониевой соли с клеткой до ее гибели, причем раздельно для двух принципиально разных биологических систем. В отношении опухолевых клеток человека впервые показано, что цитотоксический эффект изученных соединений-лидеров является результатом воздействия на митохондрии и геномный аппарат: деполяризация митохондриальной мембраны и повышение уровня активных форм кислорода провоцируют двуцепочечные разрывы ДНК, что, в свою очередь, через активацию сигнального пути ATR-p53-p21 вызывает задержку клеточного цикла в фазе G1 и, при невозможности репарации повреждений, запускает митохондриальный путь апоптоза. Выявление методом мультиплексного анализа конкретных белковых маркеров, вовлеченных в этот процесс — от CASP9 до Bad, MDM2 и фосфорилированного гистона H2A.X, — придает выводам автора высокую степень конкретности и доказательности.

Не менее существенным с точки зрения новизны представляется комплекс результатов, касающихся антимикробного действия. Соискателем впервые для данного класса соединений проведен протеомный анализ бактериальных клеток, подвергнутых воздействию фосфониевой соли, и идентифицированы белки, экспрессия которых специфически изменяется в этих условиях — от универсального стрессового белка UspA и пептидогликан-гидролазы до ферментов гликолиза и систем защиты от окислительного стресса. Эти данные вместе с результатами электронной микроскопии позволили аргументированно утверждать, что мишенью соединений служит цитоплазматическая мембрана, а не клеточная стенка, что является принципиально важным для понимания

природы отсутствия перекрестной резистентности с классическими антибиотиками.

Теоретическая значимость диссертации состоит в том, что полученные результаты формируют целостное представление о мембранотропном механизме биологического действия фосфониевых солей как об универсальной платформе, молекулярно-биологические последствия которой кардинально различаются в зависимости от типа клетки-мишени — регулируемый апоптотический каскад у эукариот и неконтролируемый ионный коллапс у прокариот.

Научно-практическая значимость работы

Практическая значимость диссертационного исследования состоит в идентификации соединений-лидеров, обладающих выгодным сочетанием высокой цитотоксической и антимикробной активности с приемлемой селективностью в отношении опухолевых клеток. Рассчитанные в работе индексы селективности дают количественное обоснование для выделения наиболее перспективных кандидатов на дальнейшую доклиническую разработку. Следует особо подчеркнуть, что автор не ограничился стандартной оценкой минимальных ингибирующих концентраций, а исследовал активность соединений в отношении биопленок — формы микробных сообществ, легко переносящей неблагоприятные условия среды, в результате чего была показана способность одного из лидеров эффективно разрушать уже сформировавшуюся биопленку. Кроме того, многопассажный эксперимент по индукции резистентности дал убедительный результат: за 17 пассажей не возникло штаммов с существенно сниженной чувствительностью, что контрастирует с поведением препаратов сравнения. Эти данные существенно повышают прикладную ценность работы и открывают перспективу для создания антимикробных средств, способных применяться в условиях уже существующей лекарственной устойчивости. Отдельного упоминания заслуживает и продемонстрированная автором противогрибковая активность соединений второго ряда, расширяющая потенциальный терапевтический профиль данных структур.

Обоснованность и достоверность результатов исследования

Обоснованность полученных результатов подтверждается тщательно продуманным планом исследования, в котором скрининговые эксперименты на широкой панели клеточных линий и микроорганизмов переходят в углубленное изучение механизмов с использованием избранных соединений-лидеров. Автором освоен и квалифицированно применен широкий арсенал современных молекулярно-биологических методов, включающий проточную цитофлуориметрию для анализа клеточного цикла, апоптоза и мембранного потенциала, мультиплексный иммуноферментный анализ на платформе MagPix для одновременной детекции семи маркеров апоптоза и семи маркеров генотоксичности, просвечивающую электронную микроскопию для визуализации ультраструктурных изменений бактерий, а также двумерный электрофорез в сочетании с MALDI-масс-спектрометрией для сравнительного протеомного профилирования. Достоверность экспериментальных данных подтверждена корректным применением методов статистической обработки. Результаты работы прошли квалифицированное рецензирование при публикации в пяти статьях в изданиях, входящих в международные базы данных, и были апробированы на двенадцати конференциях различного ранга. Все перечисленное позволяет заключить, что научные положения, выводы и практические рекомендации, сформулированные в диссертации, являются в полной мере обоснованными и достоверными.

Структура и содержание работы

Диссертация построена по классической схеме, изложена на 143 страницах и включает все необходимые разделы: введение, три главы основной части, обсуждение результатов, заключение, выводы, а также список литературы, насчитывающий 223 наименования. Работа иллюстрирована 32 рисунками и содержит 13 таблиц, что облегчает восприятие объемного экспериментального материала.

Во «**Введении**» соискателем дана развернутая характеристика проблемной области, убедительно обоснована необходимость проведения данного исследования, четко определены его цель и поэтапные задачи. Положения, выносимые на защиту, отражают основное содержание работы. Глава, посвященная **обзору литературы**, демонстрирует хорошее знание автором публикаций по тематике диссертации: рассмотрены вопросы химиорезистентности, роль митохондрий в апоптозе, антимикробные свойства фосфониевых солей, что создает необходимый контекст для интерпретации собственных результатов.

Глава 2 «**Материалы и методы исследования**» организована логично и последовательно: от определения гемолитической активности и скрининга цитотоксичности на 14 линиях клеток человека и расчета индексов селективности автор переходит к механистическим исследованиям — анализу апоптоза, митохондриального потенциала, окислительного стресса, клеточного цикла, а также к мультиплексной детекции белковых маркеров. Антимикробный блок включает определение МИК и МБК, оценку селективности, исследование резистентности, влияния на биопленки, кинетику гибели, анализ мембранотропных эффектов, электронную микроскопию и протеомное профилирование.

Раздел «**Результаты исследований**» систематически описывает проведенное исследование. На первом этапе реализована оценка гемолитической, цитотоксической и антимикробной активности для всей панели синтезированных соединений, рассчитаны индексы селективности, что позволило обоснованно выбрать соединения-лидеры для последующего углубленного изучения. Далее на клеточных линиях проведены эксперименты по анализу клеточного цикла, апоптоза, генерации активных форм кислорода, состояния митохондриального мембранного потенциала и мультиплексный анализ белковых маркеров апоптоза и генотоксичности. Параллельно в отношении бактериальных клеток исследованы кинетика гибели, влияние на биопленки, развитие резистентности, мембранотропные свойства и

морфологические изменения, включая электронно-микроскопическую визуализацию и протеомный анализ.

В главе «**Обсуждение результатов**» автор проводит сравнительный анализ собственных данных с результатами других исследователей, обосновывает интерпретацию наблюдаемых эффектов, затрагивает ограничения используемых модельных систем и в итоге синтезирует полученные факты в непротиворечивую концептуальную схему. В «**Заключении**» подведены итоги, сформулированы ключевые выводы и намечены перспективы дальнейших исследований. **Выводы** диссертации вытекают из полученных результатов и соответствуют поставленным задачам.

Общие вопросы и замечания по работе

Тем не менее, работа не лишена недостатков. Самый главный из них, на мой взгляд, заключается в том, что процессы, которые автор диссертации называет биохимическими, в общепринятой биологической практике таковыми не являются. Клеточный цикл, апоптоз, генерация АФК – все это более глобальные клеточные процессы, относящиеся к области молекулярной биологии и цитологии, в то время как биохимическими процессами принято называть метаболические и катаболические реакции, протекающие в клетках. Таким образом, название диссертации и вывод 2 про характеризацию ключевых биохимических событий цитотоксического механизма являются терминологически неверными.

Также следует отметить и другие проблемы работы:

1. Первое положение, выносимое на защиту, является установленным фактом, подтвержденным данными многих научных публикаций.
2. В работе в качестве условно-нормальной модели использована клеточная линия Chang Liver, которая загрязнена HeLa. Поэтому использовать данную линию в качестве референса для расчета индекса селективности без обязательной генетической проверки, опираясь на

чужие литературные данные, нельзя. Проводилась ли такая проверка? Если да, это должно быть упомянуто в работе. Если нет, эти результаты представляются сомнительными, и непонятно, почему автор выбрал для работы именно эту клеточную линию.

3. В работе не уточняется, почему в качестве основной модели для исследования механизмов цитотоксичности выбрана клеточная линия M-HeLa.
4. Хотелось бы увидеть более подробное описание интерпретации результатов, представленных на рис. 18 диссертации и рис. 2 автореферата (окрашивание Annexin V - PI). Почему автор считает мертвыми клетки PI+/An-, а клетки, окрашенные PI+/An+ - поздней стадией апоптоза? Согласно протоколу к использованному в работе набору для определения апоптоза субпопуляция PI+/An+ считается мертвыми клетками, в то время как субпопуляцию PI+/An- обычно считают некротическими клетками.
5. Согласно графику на рис. 6 автореферата и рис. 22 диссертации, вещество 5б в концентрации 3 мкМ не вызывает цитостатического эффекта. С чем это может быть связано?
6. Рис. 26 диссертации и рис. 9 автореферата следовало бы снабдить статистической достоверностью различий.
7. Результаты, представленные в Таблице 1 автореферата, не подтверждают зависимости цитотоксических свойств от длины алкильной цепи. Для выявления такой зависимости необходимо оценить статистическую достоверность различий полученных значений друг от друга.
8. После ссылки на рис. 3 в тексте автореферата сразу идет ссылка на рис. 7, хотя перед ним по правилам нужно было бы сослаться на рис. 4-6.
9. Рис. 2 и 7 автореферата даны слишком мелко.
10. Разделы литературного обзора, посвященные онкологическим заболеваниям и антимикробной терапии, никак не связаны друг с другом. Первый раздел внезапно обрывается без всяких выводов, и начинается второй.

11. Многие рисунки в литературном обзоре даны слишком мелко.
12. Из описания протокола МТТ (разд. 2.5.2) неясно, что именно окрашивали раствором МТТ – клетки или отобранную питательную среду.
13. Раздел 2.5.3 (окрашивание клеток китом Annexin V- Alexa Fluor): согласно протоколу производителя, инкубацию с красителями проводят в течение 15 мин, что, в частности, связано с достаточно высокой токсичностью йодида пропидия. Почему в работе инкубация проводилась в течение 40 мин? Кроме того, указанные в работе объемы красителей – 0.35 мкл и 0.1 мкл для аннексина и PI, соответственно – сильно отличаются от заявленных в протоколе 5 мкл и 1 мкл. С чем это связано? Достоверность полученных результатов при работе с подобными наборами напрямую зависит от строгого следования протоколам. Если авторы по какой-то причине отклонились от протокола, это должно быть обосновано, а достоверность полученных результатов должна быть подтверждена соответствующими сравнительными экспериментами.
14. Раздел 2.6.1: «Разведения исследуемых соединений готовили непосредственно в питательной среде с добавлением 5% диметилсульфоксида (ДМСО) для лучшей растворимости». Известно, что 5% ДМСО может убивать бактериальные клетки. Ставился ли отдельный контроль с раствором ДМСО без тестируемых соединений?
15. Описание результатов начинается внезапно с цитотоксичности изученных веществ без какого-либо предварительного раздела, посвященного их структурным особенностям и обоснованию выбора объекта исследования. Такой раздел очень помог бы восприятию работы.
16. В Таблицах 2-4 и 8-10 не указано, какой статистикой снабжены измерения.
17. Результаты, представленные в Таблице 3, необходимо снабдить оценкой статистической достоверности различий, что позволило бы оценить

влияние структурных особенностей на цитотоксичность. То же самое касается и различий в чувствительности разных клеточных линий к одному соединению.

18. В автореферате и диссертации много стилистических и пунктуационных ошибок, опечаток, жаргонизмов, неудачных грамматических конструкций. Например, правильно писать не алкил-2-гидроксибензилфосфоний хлориды, а хлориды алкил-2-гидроксибензилфосфония.

Тем не менее, несмотря на вышеперечисленные недостатки, плюсы работы в целом перевешивают минусы. Надеюсь, в будущем автор избавится от терминологической путаницы и будет продолжать свои несомненно значимые исследования в области молекулярной биологии.

Заключение

Диссертационная работа Любиной Анны Павловны «Биохимические аспекты механизмов цитотоксического и антимикробного действия новых производных фосфониевых солей», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по научной специальности 1.5.4. Биохимия (биологические науки), является завершенной, самостоятельно выполненной научно-квалификационной работой, в которой на основании комплекса современных молекулярно-биологических и микробиологических методов решена актуальная задача по определению механизмов цитотоксического и антимикробного действия новых производных фосфониевых солей. Полученные результаты вносят заметный вклад в биохимию мембраноактивных соединений и имеют перспективы практического приложения.

По своей актуальности, уровню исполнения, научной новизне, теоретической и практической значимости, достоверности и обоснованности выводов диссертационная работа полностью соответствует требованиям п 9-11, 13 и 14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденным Постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24 сентября

2013 года, установленным требованиям к кандидатским диссертациям. Автор работы Любина Анна Павловна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия (биологические науки).

Официальный оппонент:

Ведущий научный сотрудник Лаборатории металлокомплексных и наноразмерных катализаторов №30 Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского Российской академии наук, доктор химических наук по специальности 1.4.9 Биоорганическая химия.

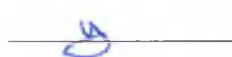
 Егорова Ксения Сергеевна
«16» июня 2026 г.

Подпись д.х.н. Егоровой Ксении Сергеевны заверяю:

 Мселехина Валерия Григорьевна
ВРИО ученого секретаря ИОХ РАН, к.х.н.

«16» июня 2026 г.

Согласен на сбор, обработку, хранение и передачу моих персональных данных при работе диссертационного совета 24.1.218.01 по диссертационной работе Любиной Анны Павловны на тему «Биохимические аспекты механизмов цитотоксического и антимикробного действия новых производных фосфониевых солей», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия (биологические науки).

 Егорова Ксения Сергеевна
«16» июня 2026 г.

Адрес места работы: 119991, г. Москва, Ленинский проспект, дом 47

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского Российской академии наук

Должность: ведущий научный сотрудник Лаборатории металлокомплексных и наноразмерных катализаторов №30

Телефон: +7(925)-047-3044

E-mail оппонента: egorova-ks@ioc.ac.ru