

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

профессора кафедры фармакологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации доктора медицинских наук, доцента Шулькина Алексея Владимировича на диссертационную работу Григоркевич Оксаны Сергеевны «Дизайн, синтез и изучение спектра фармакологической активности оригинальных ингибиторов матриксных металлопротеиназ 2-го и 9-го типов», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология

Актуальность темы исследования

Сердечно-сосудистые и онкологические заболевания являются основными причинами смертности во всем мире, в том числе и в России. Несмотря на появление новых подходов к терапии данных заболеваний кардинально изменить эффективность их лечения пока не удастся, поэтому постоянно ведется поиск новых классов лекарственных препаратов.

Одними из перспективных мишеней для фармакотерапии могут являться матриксные металлопротеиназы 2-го и 9-го типов (ММП-2 и ММП-9). Их экспрессия резко возрастает в патологических условиях под действием провоспалительных цитокинов, окислительного стресса, а также ростовых факторов и связана с развитием и прогрессированием ряда онкологических, сердечно-сосудистых, нейродегенеративных и других заболеваний. На данный момент в мире практически отсутствуют селективные ингибиторы ММП-2 и ММП-9, которые были бы внедрены в клиническую практику.

В связи с этим диссертационная работа Григоркевич О.С., целью которой было создание фармакологически перспективных селективных ингибиторов матриксных металлопротеиназ 2-го и 9-го типов, является актуальной.

Научная новизна исследования и полученных результатов

В ходе выполнения своего исследования О.С. Григоркевич получены оригинальные результаты. С использованием фармакофорной модели и молекулярного докинга сконструированы и затем синтезированы 10 новых

потенциальных ингибиторов ММП-2 и ММП-9. На примере 3-х соединений показана ингибирующая активность по отношению к ММП-2, из которых одно (ГГМ-27) также ингибировало ММП-9. На примере двух синтезированных соединений (АЛ-828; ГГМ-27) показаны их нейропротекторные свойства *in vitro* в микромолярных концентрациях. Для соединения ГГМ-27 выявлена противоопухолевая активность на модели аденокарциномы молочной железы, сопоставимая по выраженности эффектов с препаратом сравнения доксирубицином. Соединение АЛ-828 показало антиметастатическую активность на модели карциномы легких Льюис. Установлено, что соединение АЛ-828 на модели острого инфаркта миокарда на крысах снижало объем инфаркта более чем на 50%, его эффект был более выраженный, чем у препарата сравнения – доксициклина. Также было показано, что кардиопротективный эффект АЛ-828 коррелирует с содержанием ММП-2 и ММП-9 в плазме крови крыс с острым инфарктом миокарда. Важно, что полулетальные дозы активных соединений как минимум в 100 раз превосходили терапевтические.

В результате работы были разработаны два соединения, которые могут стать основой для создания соответствующих лекарственных средств. Соединение ГГМ-27, с ингибирующей активностью по отношению к ММП-2 и ММП-9, обладает противоопухолевым эффектом. Соединение АЛ-828, ингибитор ММП-2, обладает антиметастатической и кардиопротективной активностями.

Таким образом, в ходе работы было получено значительное количество оригинальных данных, степень новизны которых подтверждает высокую научную и практическую ценность диссертационной работы О.С. Григоркевич.

Степень обоснованности и достоверность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и практических рекомендаций диссертационной работы Григоркевич Оксаны

Сергеевны не вызывает сомнений. Проведенное исследование представляет собой комплексную многоаспектную работу, выполненную на высоком научно-методическом уровне. Автором используются современные, высокоинформативные методы и подходы к оценке фармакологической активности синтезированных соединений. Сформулированные автором положения, выносимые на защиту, выводы и практические рекомендации полностью подтверждаются проведенным исследованием и соответствуют поставленной цели и задачам. Достоверность полученных данных и обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций подтверждается применением современных методов статистического анализа. Стоит подчеркнуть и значительный уровень апробации результатов исследования, которые были представлены в докладах на 6 конференциях, в том числе международного уровня (XIII International Conference on Chemistry for Young Scientists "MENDELEEV 2024", Санкт-Петербург, 2024).

Содержание работы, ее оформление и завершенность

Рецензируемая диссертация изложена на 159 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов исследования и их обсуждения, заключения и выводов, практических рекомендаций, списка используемой литературы, содержит 21 таблицу и 61 рисунок. Библиографический указатель состоит из 252 источников (59 отечественных и 193 иностранных).

Во введении, опираясь на новейшие литературные источники, автор аргументирует актуальность выбранной темы с акцентом на целесообразность синтеза и разработки селективных ингибиторов МПП-2 и МПП-9. Автор ясно формулирует цель исследования и конкретизирует его задачи.

Обзор литературы, включает 5 частей (44 страницы, 201 литературный источник) и посвящен матричным металлопротеиназам (ММП). В нем собраны данные по классификации матричных металлопротеиназ, их структуре, механизмам активации и действия, а также представлена

информация о роли ММП в патологических процессах. Важной частью обзора является описание подхода к конструированию потенциальных ингибиторов ММП. В обзоре приведены представители ингибиторов с различной активностью. Обзор является содержательным и позволяет наметить новые направления в области создания ингибиторов ММП с различными фармакологическими эффектами.

Материалы и методы исследования. Исследование выполнено *in silico* (молекулярный докинг), *in vitro* (на ММП-2, ММП-9 и на иммортализованных клетках гиппокампа линии НТ-22) и *in vivo* (на беспородных белых мышьях-самцах, инбредных мышьях-самцах, мышьях-самках линии С57ВL/6 и беспородных белых крысах-самцах).

Синтез сконструированных ингибиторов ММП-2 и ММП-9 осуществляли методами классического органического синтеза в растворе. Структура подтверждалась методом ЯМР-спектроскопии, хроматографическая гомогенность – методом тонкослойной хроматографии и высокоэффективной жидкостной хроматографии, химическая чистота – данными элементного анализа и масс-спектрометрии.

После синтеза сконструированных соединений были проведены эксперименты *in vitro* для определения констант ингибирования некоторых из полученных соединений по отношению к ММП-2 и ММП-9, а также эксперименты по выявлению нейропротекторной активности при моделировании окислительного стресса на клетках линии НТ-22. На следующем этапе для изучения спектра фармакологической активности для синтезированных соединений были проведены *in vivo* эксперименты по выявлению антигипоксической, противоопухолевой, антиметастатической активностей и определению острой токсичности. Для одного из соединений были проведены *ex vivo* и *in vivo* эксперименты по изучению кардиопротективного эффекта.

В главе 3 представлены полученные результаты и их обсуждение.

С применением метода молекулярного моделирования сконструированы

оригинальные ингибиторы ММП 2 и ММП 9 на основе N-замещенных-[бензоиламино(фенилсульфонил)]- циклических аминокислот.

Сконструированные соединения I(АЛ-828), II(МЛ-269), III(КМ-29), IV(МЛ-292), V(МЛ-293), VI(ГО-10), VII(ГО-47), VIII(ГГМ-10), IX(ГГМ-14), X(ГГМ-27) были синтезированы по универсальной высокотехнологичной методике в 3 стадии с общим выходом около 50%.

Затем в опытах *in vitro* была оценена ингибирующая активность по отношению к ММП-2 и ММП-9 для соединений АЛ-828, МЛ-269 и ГГМ-27. С использованием флуорогенного субстрата Mca- Lys- Pro- Leu- Gly- Leu- Dpa- Ala- Arg- NH₂ и рекомбинантных ММП- 2 и ММП- 9 человека для соединений АЛ-828 и МЛ- 269 определены константы ингибирования по отношению к ММП-2. Для соединения ГГМ-27 была выявлена ингибирующая активность как по отношению к ММП-2, так и к ММП- 9.

Для соединений АЛ-828 и ГГМ-27 установлена нейропротекторная активность на модели окислительного стресса с использованием клеток НТ-22 в концентрациях 10^{-8} М и 10^{-5} – 10^{-6} М соответственно.

В экспериментах *in vivo* для ингибитора ММП-2, соединения АЛ-828, была показана антиметастстическая активность на модели эпидермоидной карциномы легкого Льюис. Для ингибитора ММП-2 и ММП-9, соединения ГГМ-27, была показана противоопухолевая активность и достоверное увеличение средней продолжительности жизни животных на модели аденокарциномы молочной железы Са755. При этом АЛ-828 и ГГМ-27 относились к малотоксичным соединениям.

В эксперименте по изучению влияния курсовой терапии на размер экспериментального инфаркта миокарда выявлено, что АЛ-828 более чем в 2 раза уменьшает площадь инфаркта по сравнению с контролем, также уменьшает интенсивность ремоделирования миокарда и поддерживает его инотропную функцию в острой фазе инфаркта миокарда. В проведенных экспериментах по изучению кардиопротективного действия было показано, что соединение АЛ-828 у интактных животных не оказывает влияния на

величину артериального и венозного давления, на структуру электрокардиографии и вариабельность ритма сердца. При этом АЛ-828 обладает способностью уменьшать содержание как ММП-2, так и ММП-9 в плазме крови крыс с острым инфарктом миокарда. Для соединения АЛ-828 также показана антигипоксическая активность на модели нормобарической гипоксии с гиперкапнией.

Общий взгляд на решаемую задачу представлен в главе «Заключение», послужившей основой для шести выводов, которые логично вытекают из содержания диссертации и соответствуют поставленным целям и задачам. Практические рекомендации также являются вполне обоснованными.

Апробация результатов исследования

По результатам диссертационной работы опубликовано 7 статей, 5 из которых в периодических научных изданиях из списка ВАК; 3 патента на изобретение РФ; 7 тезисов устных и стендовых докладов на конференциях и съездах российского и международного уровней.

Соответствие содержания автореферата основным положениям диссертации

Автореферат полностью отражает содержание и основные положения диссертационной работы. Оформление автореферата соответствует современным требованиям.

Диссертационная работа Григоркевич Оксаны Сергеевны представляет собой завершенное научно-квалифицированное исследование, заслуживающее высокой оценки. Содержание, структура и оформление диссертации в полном объеме соответствует требованиям, предъявляемым к работам на соискание ученой степени кандидата наук.

Замечания и вопросы

Работа О.С.Григоркевич в целом выполнена на высоком уровне,

изложена четко и аргументировано. В ходе анализа работы возникли следующие вопросы:

1. В литературном обзоре рассмотрены ингибиторы ММП различных структур. Среди всех исследованных ингибиторов самыми активными являются ингибиторы на основе гидроксамовых кислот. Почему при конструировании своих ингибиторов вы сделали упор на соединения на основе карбоновых кислот?

2. В связи с чем не изучалась фармакологическая активность соединения МЛ-269, которое, как и АЛ-828 проявляло селективную ингибирующую активность по отношению к ММП-2?

3. В каком направлении вы планируете дальше развивать соединения-лидеры?

4. Как вы думаете могут ли синтезированные соединения влиять и на другие фармакологические мишени, которые могли бы объяснить выявленное антиоксидантное и антигипоксическое действие?

Заключение

На основании актуальности выбранной темы, большого фактического материала, научной новизны и практической значимости результатов исследования, возможности внедрения их в практику можно заключить, что диссертационная работа Григоркевич Оксаны Сергеевны на тему «Дизайн, синтез и изучение спектра фармакологической активности оригинальных ингибиторов матриксных металлопротеиназ 2-го и 9-го типов», выполненная под руководством члена-корреспондента РАН, доктора биологических наук, профессора Гудашевой Татьяны Александровны и представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология, является самостоятельным, законченным научным квалификационным исследованием, решающим актуальную научную задачу в области фармакологии – получение фармакологически пригодных селективных ингибиторов матриксных металлопротеиназ 2-го и 9-го типов, как основы для разработки противоопухолевых и кардиопротекторных лекарственных средств, что

вносит существенный вклад в развитие экспериментальной и клинической фармакологии.

Диссертация О.С. Григоркевич полностью отвечает всем требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней» (Постановление правительства РФ от 24.09.2013 № 842 в действующей редакции), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а её автор, Григоркевич Оксана Сергеевна, достойна присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология.

Официальный оппонент:

профессор кафедры фармакологии
ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России,
доктор медицинских наук (3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология),
доцент

25.11.2025



Алексей Владимирович Щулькин

Подпись д.м.н., доцента Щулькина А.В. заверяю:
проректор по научной работе и инновационному развитию
ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России,
д.м.н., профессор



И.А. Сучков

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Адрес: 390026 г. Рязань, ул. Высоковольтная, д. 9

Тел: +7 4912 971801

Адрес электронной почты: rzgmu@rzgmu.ru

