

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу ЗАХАРЯНЦ Арпеник Акоповны "Доклиническая оценка биотрансформации новых антигипоксических соединений в системе *in vitro* с имитацией микроциркуляции», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Диссертационная работа ЗАХАРЯНЦ Арпеник Акоповны посвящена разработке *in vitro* системы доклинической оценки токсичности лекарственных препаратов и продуктов их биотрансформации с использованием адекватных клеточных моделей печени человека, культивируемых в микробиореакторах. Необходимость выполнения такой работы связана с созданием платформы, обеспечивающей быстрый недорогой и эффективный поиска новых потенциальных лекарств.

Актуальность темы диссертации

Инфаркт и инсульт в последнее время являются одними из основных причин смерти. Поэтому поиск лекарственных препаратов против гипоксии, возникающей в результате инфаркта и инсульта, является одним из актуальнейших направлений современной науки. В организме в условиях гипоксии происходит активация транскрипционного фактора HIF (hypoxia inducible factor), который запускает экспрессию около ста различных генов для преодоления гипоксии. Стабильность фактора HIF в клетке регулируется специальной системой, первым этапом которой является гидроксилирование остатка пролина альфа-субъединицы HIF с помощью специального фермента пролилгидроксилазы (существует в виде трех изоферментов). Считается, что ингибирование активности пролилгидроксилазы позволит повысить уровень фактора HIF и, таким образом, усилить экспрессию генов, ответственных за преодоление гипоксии. В настоящее время ведущие мировые биотехнологические фирмы проводят активный поиск таких ингибиторов и несколько таких ингибитора находятся на различных стадиях клинических испытаний. Работы в данной области в сентябре 2016 года были отмечены премией Ласкера, что указывает на их высокую актуальность. В 2010 году коллективом под руководством д.х.н. И.Г.Газарян с помощью клеточной репортерной системы были найдены два соединения, которые активировали действие фактора HIF, однако молекулярный механизм (в частности, ингибирование пролилгидроксилазы) изучен не был.

1. Достоверность и новизна результатов и выводов диссертационной работы.

На основании проведенной исследовательской работы автором сделано 6 выводов. Все выводы диссертационной работы ЗАХАРЯНЦ А.А. основаны на большом экспериментальном материале, соответствуют поставленным в диссертации задачам и полностью отражают результаты работы. В то же время, необходимо отметить, что выводы оказались очень многословными. Пожелание диссертанту быть лаконичнее при формулировании выводов работы. Для достижения цели и решения задач диссертант использовала широкий круг молекулярно-биологических и биохимических методов (гетерологичная экспрессия генов пролилгидроксилазы, рефолдинг белка, изучение ингибирования, культивирование в микробиореакторах и др.), а также масс-спектрометрические методы анализа продуктов биотрансформации.

Используемые в данной работе методы гетерологичной экспрессии и получения активных рекомбинантных белков за счет рефолдинга, а также методы ингибиторного анализа и использования микрореакторов с микроциркуляцией являются современными, в полной мере, соответствующими мировому уровню исследований. Они характеризуются высокой надежностью и воспроизводимостью, что позволяет соотносить результаты, полученные в диссертационной работе ЗАХАРЯНЦ А.А. с результатами других научных групп. В этой связи не вызывает сомнений достоверность каждого результата и вывода диссертационной работы.

Диссертационная работа обладает несомненной новизной как в области получения рекомбинантной пролилгидроксилазы человека, так и в изучении и ингибирования данного фермента. Впервые показано на чистых ферментах, что молекулы кандидаты в антигипоксанты являются истинными ингибиторами пролилгидроксилазы человека. Впервые разработана система на основе клеток печени НераRG и микробиореакторов для тестирования гепатотоксичности молекул-кандидатов и продуктов их биотрансформации.

2. Ценность полученных в диссертационной работе результатов для науки и практики.

Разработанная диссертантом система тестирования гепатотоксичности с использованием клеток печени НераRG и микробиореакторов позволяет проводить доклиническую оценку токсичности молекул-кандидатов и продуктов их биотрансформации, что значительно сокращает затраты времени на изучения

гепатотоксичности при научном поиске и практической стадии оценки новых молекул-кандидатов

3. Содержание диссертации

Диссертация Захарянц А.А. построена по стандартной схеме и начинается с Введения, в котором дается подробное описание текущей ситуации в области разработки новых лекарственных препаратов и обосновывается актуальность и важность данной работы. Далее в обзоре литературы кратко рассмотрены механизм катализа цитохромом P450 и проблемы предсказания характера продуктов окисления, обсужден уникальный спектр изоформ цитохрома P450, присущий человеку, и обоснована необходимость тестирования лекарственных средств именно на препаратах печени человека, подробно описываются современные подходы к стандартизации культур клеток гепатоцитов и псевдо-гепатоцитов, генерируемых при определенной обработке иммортализованных линий клеток печени человека. В результате обсуждения показано, что в данный момент наиболее перспективно использование «гепатоцитов», полученных дифференцировкой линии НераRG, использованной в работе. Приведены данные по конструкции микробиореактора с имитацией микроциркуляции – «печени на чипе» и его оптимизации для целей настоящей работы. В заключение кратко описано современное состояние в области разработки антигипоксических лекарственных препаратов, действующих по механизму стабилизации фактора, индуцируемого гипоксией (HIF). Таким образом, литературный обзор полностью подготавливает читателя к последующему изложению результатов работы, выполненной на стыке целого ряда научных направлений. Обзор хорошо написан, снабжен всеми необходимыми иллюстрациями и может быть интересен широкому кругу специалистов в области современных методов разработки и доклинической характеристики лекарственных препаратов.

В разделе «Материалы и методы» подробно описаны методики работы с ДНК (клонирование генов, экспрессия и др.), методики получения и культивирования штаммов *E.coli* – продуцентов рекомбинантных HIF продилгидроксилаз, методики их выделения, рефолдинга, и контроля чистоты, а также методы определения активности. Также в этой части работы приведено подробное описание культивирования и дифференцировке НераRG клеток и формирования из них трехмерных сфероидов. Также детально описаны протоколы доклинического исследования лекарственных препаратов в «печени на чипе».

Раздел «Результаты и их обсуждение» состоит из двух больших частей, которые соответствуют тем задачам, которые решались в работе. Первая часть посвящена

клонированию, экспрессии в клетках *E.coli*, и разработке метода реактивации ННФ пролилгидроксилазы 2 из телец включения и ее использованию для подтверждения прямого ингибиторного действия двух потенциальных антигипоксических препаратов, отобранных ранее с помощью методов высокопроизводительного скрининга на клеточных репорных культурах. Вторая часть работы посвящена разработке и апробации панели субстрат-ингибитор для четырех наиболее значимых изоформ цитохрома Р450 человека для ее последующего использования предсказания гепатотоксичности и путей биотрансформации исследуемых в работе соединений.

Успех в разработке метода реактивации данного исключительно нестабильного фермента из телец включения напрямую зависел от разработки способа непрерывной регистрации активности фермента. Диссертант придумал довольно оригинальный способ непрерывной регистрации активности – по активации побочной реакции окисления ферроцианида в присутствии физиологического субстрата фермента – ННФ пептида. Единственным неудобством метода является необходимость проведения гель-фильтрации перед измерением активности для удаления дитиотрейтола. И, хотя данная реакция не является физиологической (она представляет собой полуреакцию физиологического цикла), она позволяет легко регистрировать ферментативную активность и проводить оптимизацию метода реактивации и очистки фермента. Довольно неожиданным результатом явилась более высокая удельная активность в физиологической реакции у фермента, полученного реактивацией, по сравнению с ферментом, выделенным из растворимой фракции. Однако, с учетом исключительной нестабильности фермента, продемонстрированной диссертантом, можно согласиться с автором в том, что инактивация растворимой фракции этого гетерологично экспрессируемого фермента может происходить уже в процессе его накопления внутри клеток *E.coli*. Полученный препарат фермента был использован для доказательства прямого ингибирующего эффекта двух новых потенциальных антигипоксических препаратов, идентифицированных ранее на клеточных культурах.

Во второй части работы автором был проведен тщательный анализ литературы по субстратной специфичности четырех изоформ цитохрома Р450 и отобраны наиболее специфические субстраты для каждой из них. Также был проведен тщательный анализ констант ингибирования известных ингибиторов данных изоформ Р450 с тем, чтобы отобрать ингибиторы, действующие лишь на одну из четырех изоформ Р450 в определенном диапазоне концентраций. Далее было потрачено, по-видимому, много сил и времени на оптимизацию хромато-масс-спектроскопической детекции четырех

индивидуальных субстратов и продуктов их метаболизма в смеси. Только в случае тестостерона детекция проводилась по убыли исходного субстрата, для трех остальных субстратов были разработаны методики детекции по основному продукту гидроксилирования. Данная часть работы хорошо проиллюстрирована оригинальными спектрами, хроматограммами, и калибровочными зависимостями, но изложена лаконично.

Разработанная панель субстрат-ингибитор была успешно опробована на двух лекарственных препаратах, механизм биотрансформации которых хорошо известен. Диссертанту пришлось оптимизировать метод детекции данных препаратов и их метаболитов в смеси таковых для панели субстрат-ингибитор. В заключительной части работы, новый антигипоксические препараты были исследованы в «печени на чипе». Во-первых, было показано отсутствие токсичности в широком диапазоне концентраций, и во-вторых, идентифицированы изоформы P450, принимающие участие в метаболизме исследуемых соединений. Предложена гипотетическая схема биотрансформации, основанная на известных свойствах данных изоформ P450 гидроксилировать замещенные оксихинолины. Открытием диссертанта является активация изоформы 2B6 цитохрома P450 под действием изучаемых соединений, которая может являться предметом будущих изысканий по части механизма этого явления. Следует отметить, что именно эта изоформа цитохрома P450 отличается наибольшим полиморфизмом у человека, и именно с ней связывают появление «необычных» продуктов гидроксилирования.

В целом можно сказать, что автор полностью выполнила намеченные эксперименты и с блеском решила поставленные в работе задачи. Автореферат диссертации и публикации автора полно отражают содержание работы. Все выводы диссертации Захарянц А.А. хорошо обоснованы и их достоверность не вызывает сомнений. Необходимо отметить высокое качество не только экспериментальной работы диссертанта, но и подготовки и оформления диссертации. Вся работа написана хорошим литературным языком, очень хорошо структурирована, снабжена четкими и аккуратными рисунками и понятными таблицами. В работе мало грамматических ошибок, но имеются опечатки.

4. Опубликование результатов диссертации в научной печати.

Результаты и выводы диссертационной работы Захарянц А.А. в полном объеме представлены в печатных работах - в 3 статьях, опубликованных в Российских центральных научных журналах, рекомендованных ВАК АК МОН РФ. Материалы диссертации неоднократно представлялись на международных и отечественных конференциях.

5. *Содержание автореферата.*

Содержание автореферата полностью соответствует основным положениям диссертации.

6. *Заключение*

Диссертационная работа ЗАХАРЯНЦ Арпеник Акоповны "Доклиническая оценка биотрансформации новых антигипоксических соединений в системе *in vitro* с имитацией микроциркуляции» является оригинальным исследованием и полностью соответствует требованиям п.9-14 "Положения о присуждении ученых степеней", утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24.09.2013 г. (в редакции Постановления Правительства РФ №723 от 30.07.2014 г), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата химических наук, а ее автор, безусловно, заслуживает присуждения искомой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.06 - биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Заместитель директора по научной работе

Государственного научного центра РФ

ФГБУ «Государственный научно-исследовательский

институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов»

(117545 Россия, Москва, 1-й Дорожный проезд, д. 1

www.genetika.ru, тел. 8(495)3151247,

e-mail оппонента: yanenko@genetika.ru)

доктор биологических наук, профессор

Яненко Александр Степанович

Подпись д.б.н., профессора Яненко А.С. заверяю

Ученый секретарь

Государственного научного центра РФ

ФГБУ «Государственный научно-исследовательский

институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов»,

кандидат химических наук



Яроцкий Сергей Викторович

28 ноября 2016 г.