

ОТЗЫВ

официального оппонента

на диссертационную работу Цымбала Сергея Алексеевича «Механизмы гибели опухолевых клеток при комбинировании медьсодержащих и тиоловых соединений», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4 – Биохимия

Актуальность диссертационной темы

Важной проблемой противоопухолевой терапии является развитие лекарственной устойчивости (ЛУ) опухолевых клеток, что не только приводит к снижению эффективности действия химиопрепаратов, но и способствует развитию рецидива, ухудшая результаты лечения и прогноз для пациентов. Формирование ЛУ имеет многофакторный характер, наиболее известные механизмы её развития включают снижение поступления противоопухолевого препарата в клетку за счёт усиления систем обратного транспорта, активацию процессов репарации ДНК и детоксикации лекарственных средств и их активных метаболитов, гиперэкспрессию или мутации молекул-мишеней цитостатиков, подавление систем клеточной гибели.

Учитывая важный вклад ЛУ опухоли в отрицательный прогноз для онкобольных, активно разрабатываются способы и методы её преодоления. В настоящее время известен ряд подходов для борьбы с устойчивостью, включая модификацию структуры лекарственного препарата, комбинированную терапию с использованием нескольких препаратов и адресную доставку наночастицами, однако проблема все еще остается нерешенной, что во многих случаях связано с блокированием механизмов апоптоза.

Значительная роль в регуляции и индукции апоптоза в опухолевых клетках принадлежит активным формам кислорода (АФК), которые тем самым играют центральную роль в модуляции пролиферации и выживания. Уровни АФК и активность антиоксидантных ферментов в устойчивых к

противоопухолевым препарата с прооксидантным действием опухолевых клетках выше, чем в раковых клетках без МЛУ и нормальных клетках, делая их более восприимчивыми к изменениям уровней АФК. Поэтому соединения, способные модулировать уровни АФК, могут оказывать сенсibiliзирующий эффект и усиливать ответ на определенные химиотерапевтические препараты.

АФК могут продуцироваться довольно широким спектром соединений, включая медьсодержащие. Органические комплексы и наночастицы на основе меди рассматриваются как перспективные противоопухолевые препараты, сравнимые с соединениями цисплатинового ряда. Цитотоксичность меди может модулироваться различными органическими молекулами, в том числе и низкомолекулярными антиоксидантами, но эти взаимодействия недостаточно изучены. В этой связи тема диссертационной работы Цымбала Сергея Алексеевича «Механизмы гибели опухолевых клеток при комбинировании медьсодержащих и тиоловых соединений», посвященная исследованию механизмов усиления цитотоксичности медьсодержащих соединений в присутствии органических восстановителей (низкомолекулярных антиоксидантов - N-ацетилцистеина и аскорбиновой кислоты) для индукции гибели опухолевых клеток (родительских и изогенных сублиний с лекарственной устойчивостью), несомненно, следует рассматривать как актуальную и важную для развития как фундаментальных представлений, так и практических подходов в регуляции редокс-зависимых механизмов гибели опухолевых клеток с ЛУ.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций.

Диссертационная работа Цымбала С.А. представляет собой научное исследование, соответствующее требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, полученных результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Все

главы взаимосвязаны и логически последовательны. Диссертационная работа изложена на 125 страницах, включает 42 рисунка и 6 таблиц.

Во введении автор убедительно обосновывает актуальность выбранной темы, формулирует цели и задачи, которые отражают логику исследования и полностью реализованы в содержании работы. В качестве замечания следует указать, что в разделе «Степень разработанности темы диссертации» следует дать краткий анализ известных работ, близких к теме диссертации. Автором же представлено резюме своей работы.

В первой главе автор анализирует литературные данные, касающиеся рассматриваемых в диссертационной работе вопросов и прежде всего механизмов формирования ЛУ опухолевых клеток: активации систем обратного транспорта, процессов репарации ДНК и детоксикации лекарственных средств и их активных метаболитов, гиперэкспрессии или мутации молекул-мишеней цитостатиков, а также подавления систем клеточной гибели (апоптоза, некроза, некроптоза, ферроптоза, купроптоза). Автор обсуждает эффективность использования оксидантной терапии в преодолении ЛУ, останавливаясь на потенциальной роли медьсодержащих соединений. Рассматриваются фармакологические препараты, терапевтический эффект которых реализуется за счёт воздействия на внутриклеточную систему перераспределения меди.

В качестве замечания следует отметить отсутствие раздела, посвященного редокс-свойствам тиольной-группы и использованию N-ацетилцистеина (NAC) и других тиольных соединений в регуляции клеточного редокс-статуса, что заметно улучшило бы обсуждение результатов работы. Кроме того, рассмотрение свойств ионов меди в редокс-зависимых реакциях следовало бы также расширить с большим вниманием к обсуждаемым реакциям (схема реакции Фентона отсутствует, реакция Габера-Вейса указана с ошибкой).

В главе «Материалы и методы исследования» детально описаны методы, которые адекватны поставленным задачам и цели диссертационного

исследования. Цымбалом С.А. применен широкий и разносторонний набор современных методических приемов, что говорит о его высокой методической подготовленности. В работе использованы: метод проточной цитометрии (для оценки фаз клеточного цикла, уровня АФК, гибели клеток, трансмембранного потенциала и иммуноокрашивания), конфокальная микроскопия с лазерным сканированием для визуализации морфологии митохондрий и контроля целостности плазматической мембраны, атомно-абсорбционная спектроскопия для определения эффективности поступления наночастиц CuO в клетки, дифференциальная сканирующая микрокалориметрия липосом, флуориметрическая оценка утечки кальцеина (флуорексона) из липосом, иммуноблотинг. Полученные результаты обработаны с помощью адекватных методов статистического анализа.

В главе «Результаты исследования» подробно изложены и обсуждаются данные, полученные при решении каждой из поставленных задач. Используемые в работе наночастицы оксида меди (НЧ CuO) получены автором методом преципитации из сульфата меди. Размер НЧ CuO (80 ± 23 нм) установлен с помощью метода динамического светорассеяния и сканирующей электронной микроскопии. Пять медьорганических комплекса синтезированы на кафедре органической химии химического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова (чистота всех соединений $\geq 95\%$). Автор говорит об определении характеристик координационных комплексов методами циклической вольт-амперометрии и вращающегося дискового электрода, указывая на рис.4 данные только для координационного соединения FS-Me²⁺. Никакого обсуждения характеристик координационных комплексов автор не представляет. Аналогично спектр XANES представлен на рис.5 только для 2 из 5 координационных соединений без какого-либо комментария.

При оценке цитотоксичности НЧ CuO с помощью МТТ теста Цымбал С.А. демонстрирует умеренный цитотоксический эффект (IC₅₀ 6-40 мкг/мл) на всех используемых линиях опухолевых клеток,

который значительно усиливается в присутствии NAC. Следует отметить, что ряд используемых клеточных линий (MCF-7, SKOV3, SKOV3/CDDP и др.) не указаны автором в «Материалах и методах».

Автор показывает, комбинация НЧ CuO и NAC вызывает «обращение» устойчивости клеток K562/4 к доксорубину (индекс устойчивости - 18) до чувствительности клеток дикого типа.

Использование других переходных металлов (наночастиц ZnO и Fe₃O₄, а также Co и MoS₂) в сочетании с NAC не вызывает эффекта усиления цитотоксичности. Среди протестированных автором аминокислот и антиоксидантов только цистеин и аскорбиновая кислота способны усиливать цитотоксичность НЧ CuO.

Определение кинетики гибели клеток методом проточной цитофлуориметрии позволило Цымбалу С.А. установить достаточно высокую скорость этого процесса (в первые часы после добавления комбинации выявляется фракция клеток, окрашиваемых пропидий иодидом, которая через 9 ч уже составляет 80% от общего числа клеток) и обнаружить индукцию окислительного стресса с использованием красителя CM-H₂DCFDA.

В ходе дальнейшего исследования механизма гибели клеток, вызванного комбинацией медьсодержащих соединений и NAC, автор получает доказательство, что наиболее вероятным является некроз. Отсутствие активации каспазы-3 и расщепления PARP и отрицательные результаты при использовании некростатина-1 и токоферола позволили автору отклонить предполагаемые механизмы апоптоза и некроптоза. Кроме того, автор получает данные, свидетельствующие об окислении тиольных групп в результате реакции с медьсодержащими соединениями, и обнаруживает быстрое восстановление меди (II) до одновалентной в присутствии NAC. Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что эффект значительного усиления цитотоксичности медьсодержащих веществ (НЧ, солей и органических комплексов) при добавлении восстановителей связан с

усилением генерации АФК и быстрым повреждением мембран, что приводит к гибели клеток.

В ходе исследования действия комбинаций медьсодержащих соединений и NAC на мышах Balb/c Цымбал С.А. устанавливает оптимальные нетоксичные дозы для внутрибрюшинного введения на модели асцитной опухоли Эрлиха. Определение противоопухолевой эффективности не позволило выявить значимого увеличения продолжительности жизни мышей, однако, удалось зафиксировать торможение скорости роста опухоли. Автор делает вывод о рассмотрении в дальнейшем необходимости многократного введения комбинации для значимого пролонгированного эффекта.

Таким образом, представленные результаты убедительно показывают, что цель исследования успешно достигнута: автором установлен перспективный потенциал стратегии лечения опухоли на основе электрохимического генерирования АФК. Быстрая гибель опухолевых клеток, в обход классических механизмов апоптоза препятствует формированию вторичной резистентности.

Диссертация и автореферат структурированы и оформлены согласно требованиям нормативных документов. Содержание автореферата диссертации в полной мере отражает основные аспекты диссертационной работы. Цель, задачи, положения, выносимые на защиту и выводы, приведённые в автореферате, соответствуют таковым в диссертации.

Помимо высказанных выше замечаний, следует отметить отсутствие аббревиатуры, наличие которой заметно бы улучшило восприятие работы. Однако все указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования.

Достоверность и новизна научных положений, выводов и заключений.

Представленные в диссертации результаты получены на достоверном количестве экспериментального материала с использованием современных биохимических и клеточных методов исследования, что подтверждается

соответствующим статистическим анализом. Выводы соответствуют полученным результатам.

Научная новизна полученных данных не вызывает сомнений. Автором впервые:

- показано, что эффект взаимодействия с восстановителями специфичен для соединений меди (II) в разных контекстах: наночастицы CuO, растворимая соль или металлоорганический комплекс. Помимо соединений, содержащих тиольную группу, восстанавливать двухвалентную медь способны и другие агенты, например, аскорбиновая кислота. Другие переходные металлы не взаимодействуют с указанными восстановителями;
- показано протекание гибели клеток без активации классических механизмов апоптоза, что расширяет терапевтический потенциал комбинаций;
- установлена возможность снижения опухолевой нагрузки у лабораторных мышей-опухоленосителей при введении комбинации медьорганического соединения и восстановителя.

Ключевые положения диссертации опубликованы в 3 статьях в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК и индексируемых в базах Scopus и Web of Science. На основании полученных данных зарегистрирован патент РФ. Материалы работы успешно представлены на 15 международных и всероссийских научных конференциях.

Заключение

Таким образом, диссертация Цымбала Сергея Алексеевича на тему «Механизмы гибели опухолевых клеток при комбинировании медьсодержащих и тиоловых соединений», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. «Биохимия», является законченной научно-квалификационной работой, в которой решена актуальная научная задача изучения механизмов усиления цитотоксичности медьсодержащих соединений в присутствии органических восстановителей (низкомолекулярных антиоксидантов - N-ацетилцистеина и аскорбиновой кислоты) для индукции гибели опухолевых клеток (родительских и изогенных субклиний с лекарственной устойчивостью).

Диссертационная работа полностью соответствует критериям, предъявляемым к диссертациям, установленным разделом 2 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 (в действующей редакции), а ее автор – Цымбал Сергей Алексеевич – достоин присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4 «Биохимия».

Официальный оппонент:

доктор биологических наук, профессор,
профессор кафедры биохимии имени академика Т.Т. Березова,
Медицинский институт, Федеральное государственное
автономное образовательное учреждение высшего образования
«Российский университет дружбы народов им. Патриса Лумумбы»
Министерства науки и высшего образования Российской Федерации
Калинина Елена Валентиновна

14.12.2023

Контактные данные:

тел.: тел 8(495)7873803 доб.1987; e-mail: kalinina_ev@rudn.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация: 03.00.04 - Биохимия

Адрес места работы: 117198, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 8

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования «Российский университет дружбы народов им. Патриса
Лумумбы» Министерства науки и высшего образования Российской
Федерации, Медицинский институт.

тел.: 8(495)7873803 доб.1987; e-mail: kalinina_ev@rudn.ru

Подпись д.б.н., профессора Калининой Е.В. удостоверяю:

Ученый секретарь медицинского института
к.фарм.н., доцент
14.12.2023



Т.В. Максимова