

ОТЗЫВ
официального оппонента на диссертацию
на соискание ученой степени кандидата биологических наук
Жирника Александра Сергеевича
на тему: «Исследование противоопухолевой активности никлозамида и
комбинированных воздействий с его использованием»
по специальности 03.01.04 – Биохимия

Диссертационная работа Александра Сергеевича Жирника посвящена изучению противоопухолевой активности никлозамида в свободной и полимерной форме на культурах клеток человека и мыши, а также способности этих препаратов усиливать цитотоксичность применяемых в клинике лекарств и действие лучевой терапии. Рост числа онкологических заболеваний обуславливает актуальность подобного рода исследований, направленных на повышение эффективности химиотерапии и лучевой терапии злокачественных новообразований.

Особенностью диссертационной работы является выбор объекта исследования. Никлозамид уже более полувека известен как антигельминтный препарат и допущен к применению в клинической практике. Когда около 10 лет назад была обнаружена противоопухолевая активность никлозамида, это вызвало интерес многих исследователей, и в настоящее время наблюдается стремительный рост количества научных работ по изучению влияния никлозамида на различные злокачественные новообразования. Таким образом, диссертационная работа А.С. Жирника современна и перспективна.

Содержание диссертации

Диссертационная работа А.С. Жирника построена по традиционному плану и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, экспериментальная часть с описанием материалов и методов работы, результаты и их обсуждение, заключение, выводы и список цитированной литературы. Диссертация изложена на 140 страницах машинописного текста, содержит 22 рисунка и 5 таблиц.

Во введении показана актуальность работы, сформулирована ее цель и задачи, отражены научная новизна, теоретическая и практическая ценность проведенных исследований.

В обзоре литературы диссертант описал физические свойства никлозамида, его противомикробное и антигельминтное действие, влияние на нормальные и опухолевые клетки млекопитающих. Обстоятельно и понятно описаны обсуждаемые в литературе механизмы цитотоксического действия никлозамида на опухолевые клетки: сигнальные пути регуляции клеточного метаболизма Wnt/β-катенин, STAT3, Notch, NF-κB, mTOR и влияние на функциональную активность митохондрий

Обращает на себя внимание значительное количество опубликованных работ, рассмотренных диссидентом (255 источников), что свидетельствует о широком знании литературы в области, выбранной для диссертационной работы. Сильное впечатление производит Приложение 1 "Противоопухолевая активность никлозамида в отношении различных линий опухолевых и нормальных клеток человека и лабораторных животных, оцениваемая по значению IC50*", в котором диссидент систематизировал данные литературы о цитотоксичности никлозамида для 33 линий нормальных клеток и около 200 линий злокачественных клеток, сопроводив эти данные описанием исследованных образцов. Результат этого кропотливого труда представляет собой ценный информационный справочник.

В экспериментальной части А.С. Жирник описал использованные в работе соединения и методы исследования: культивирование различных клеточных культур и анализ цитотоксического действия никлозамида, получение частиц, образованных сополимерами молочной и гликолевой кислот, и включение в их состав никлозамида. Следует отметить широкое использование диссидентом моноклональных антител для определения содержания белков MDR1, Bcl-2, β-катенина, гистона γH2AX с последующим анализом флуоресценции методом проточной цитофлюорометрии. Такой

набор современных экспериментальных методов, освоенных диссертантом, свидетельствует о высоком уровне его профессиональной подготовки.

Глава 3 «Результаты и обсуждение» содержит большой объем экспериментальных данных, полученных диссидентом, и их обсуждение.

Исследуя цитотоксическую активность никлозамида на семи линиях опухолевых и двух линиях нормальных клеток, А.С. Жирник продемонстрировал высокую избирательность лекарства по отношению к опухолевым клеткам. Их гибель наблюдалась при концентрациях никлозамида в 10-20 раз меньше, чем в случае нормальных клеток (табл. 3). Диссидентом обнаружен важный факт, что никлозамид токсичен не только для опухолевых клеток, чувствительных к лекарствам, но и устойчивых к ним, несмотря на то, что никлозамид в силу своей гидрофобности мог быть субстратом Р-grp.

Введение никлозамида в состав частиц сополимера молочной и гликолевой кислот вдвое усилило его цитотоксичность по отношению к опухолевым клеткам, тогда как токсичность для нормальных клеток снизилась втрое. В результате избирательность лекарства, включенного в частицы, возросла до двух порядков (табл. 4). Таким образом, диссидентом убедительно доказана целесообразность использования никлозамида, включенного в частицы сополимера молочной и гликолевой кислот.

А.С. Жирник исследовал связывание аналогичных по химическому составу ФИТЦ-меченых частиц, содержащих никлозамид, с клетками двух опухолевых линий. Диссиденту удалось продемонстрировать накопление частиц внутри клеток, используя трипан в качестве внутреннего фильтра, поглощающего излучение флюoresцеина на поверхности клеток. В результате остаточная флюoresценция отражала количество частиц внутри клеток. Показано, что максимальное поглощение частиц происходило в течение первого часа инкубации и не увеличивалось в течение суток (рис. 15), что указывает на ограниченное число мест связывания внутри клетки и насыщение. К сожалению, в этом разделе диссертации нет

контрольных экспериментов, которые позволили бы выяснить влияние никлозамида и ФИТЦ на процесс интернализации.

В отличие от этого процесса, общий уровень накопления флуоресцентной метки в исследуемых клетках неуклонно возрастал в течение суток пропорционально как концентрации, так и продолжительности инкубации с клетками (рис. 13). Этот факт указывает на неограниченно большое число мест на поверхности клеток для связывания частиц, содержащих полиэтиленгликоль.

Наряду с исследованием противоопухолевой активности никлозамида А.С. Жирник изучил возможность его комбинированного использования с ионизирующим излучением и таким классическим химиотерапевтическим препаратом как цисплатин.

Добавление цисплатина к никлозамиду, свободному или в составе частиц, существенно увеличивало цитотоксичность последнего (рис. 11Б, В). Впервые рассчитаны аддитивность действия никлозамида и цисплатина и синергизм действия связанного никлозамида и цисплатина (рис. 11Г–Е) методом Т.С. Chou и Р. Talalay. Полученные доктором факты указывают на возможность повышения эффективности лечения опухолей путём комбинированного использования никлозамида с цисплатином.

Инкубация клеток аденокарциномы прямой кишки человека линии SW837 и карциномы сигмовидной кишки человека линии COLO 320 HSR с 2 мкМ никлозамида в течение суток усиливала цитотоксичность последующего ионизирующего облучения клеток в дозе 2 Гр, применяемой в условиях однократного облучения при лучевой терапии (рис. 19).

Для выяснения механизма радиосенсибилизирующего действия никлозамида, А.С. Жирник оценил количество двунитевых разрывов в ДНК, вызываемых γ -излучением, по уровню гистона γ H2AX. Облучение в дозе 2 Гр увеличивало за 1 ч количество γ H2AX в 2 раза. Предварительная 4-часовая обработка клеток никлозамидом на этот процесс не влияла. Действие лекарства проявилось через сутки. К этому времени в отсутствие

никлозамида количество γ H2AX снижалось до нормы, тогда как в клетках предварительно обработанных никлозамидом уровень гистона γ H2AX оставался повышенным и в 1.6 раза превышал контроль (рис. 22). Этот результат позволил заключить, что никлозамид подавляет репарацию двунитевых разрывов. Таким образом, в диссертационной работе А.С. Жирника раскрыт один из механизмов радиосенсибилизирующего действия никлозамида в отношении опухолевых клеток, заключающийся в ингибировании репарации двунитевых разрывов ДНК.

Заключительная глава диссертации посвящена исследованию молекулярных механизмов цитотоксического действия никлозамида на опухолевые клетки. На основании анализа данных литературы диссертант предположил, что гибель опухолевых клеток под действием никлозамида могла быть следствием повреждения митохондрий. Это предположение подтверждено снижением накопления флюоресцентного красителя родамина-123 в митохондриях в течение часа инкубации опухолевых клеток с 1 мкМ свободного никлозамида или в составе частиц (рис. 16).

Эти факты согласуются с результатами анализа содержания активных форм кислорода и митохондриального супероксиданион-радикала (МСОАН) в клетках, обработанных свободным никлозамидом или в составе частиц. Одночасовая инкубация приводила, соответственно, к двукратному (рис. 17Е) и 4-х кратному (рис. 17Ж) увеличению количества МСОАН. Выраженность эффектов коррелировала с цитотоксичностью препаратов никлозамида.

Обнаруженные диссидентом изменения в свойствах митохондрий сопровождались нарушениями в протекании клеточного цикла. Через 24 часа после внесения 1 мкМ никлозамида в культуральную среду наблюдалось увеличение доли клеток, находящихся в G₀/G₁-фазе и уменьшение доли клеток в S-фазе (рис. 18), что может в дальнейшем приводить к гибели клеток. Таким образом, полученные диссидентом результаты подтверждают

механизм противоопухолевого действия никлозамида как следствие повреждения митохондрий.

При чтении диссертации у меня возникли следующие вопросы:

1. Если митохондрии - мишень никлозамида (вывод 5), то почему нормальные клетки более устойчивы к нему, чем опухолевые (табл. 3 и 4)?
2. Что Вам известно о содержании АФК и МСОАН в нормальных клетках? Всегда ли в опухолевых клетках их больше?
3. Как тестировали клетки с никлозамидом в концентрации 60 мкМ = 19.6 мг/л (рис. 10Г), если его растворимость 0,19–8,11 мг/л (с. 10)?

Заключение

Диссертационная работа А.С. Жирника представляет собой фундаментальное исследование, имеющее как теоретическое, так и практическое значение. Впервые установлены молекулярные механизмы радиосенсибилизирующего и противоопухолевого действия никлозамида в отношении клеток колоректального рака человека. Высокая избирательность никлозамида, включенного в полимерные частицы, по отношению опухолевым клеткам позволяет его рекомендовать для дальнейших доклинических испытаний. Радиосенсибилизирующее действие никлозамида, исследованное диссидентом, может быть использовано для повышения чувствительности опухолевых клеток к лучевой терапии.

Автореферат и публикации в полной мере отражают содержание диссертации.

Диссертация «Исследование противоопухолевой активности никлозамида и комбинированных воздействий с его использованием» является законченной научно-квалификационной работой, которая соответствует требованиям п. 9 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842, предъявляемым к диссертационным работам на соискание ученой степени

кандидата наук, а ее автор, Жирник Александр Сергеевич, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – «биохимия».

Ведущий научный сотрудник кафедры
высокомолекулярных соединений
Химического факультета
МГУ имени М.В.Ломоносова,
доктор биологических наук
по специальности 03.00.04 – «биохимия»

Гроздова Ирина Дмитриевна

Адрес: 119991, Российская Федерация, г. Москва, ГСП-1, Ленинские Горы, д.1, с.40 Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», Химический факультет
Тел.: +7(958)563-83-07
E-mail: grozdova@genebee.msu.ru

Подпись д.б.н. И.Д. Грозовой заверяю.

И.о. декана
химического факультета
МГУ имени
М.В. Ломоносова

чл.-корр. РАН
проф. Калмыков С.Н.



Дата 1 апреля 2019г.