

## **ОТЗЫВ**

**официального оппонента на диссертационную работу Жирника Александра Сергеевича на тему «Исследование противоопухолевой активности никлозамида и комбинированных воздействий с его использованием», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – «биохимия»**

### **Актуальность темы исследования**

В настоящее время онкологические заболевания остаются второй по значимости причиной смертности людей после сердечно-сосудистых заболеваний. Несмотря на появление новейших таргетных противоопухолевых препаратов, например, ингибиторов протеинкиназ B-Raf и Ras, или гуманизированных антител к опухолевым маркерам, доля и абсолютное число пациентов, умерших от опухолей молочной железы, яичника, лёгких, толстой кишки, а также лейкозов и меланом не показывает тенденции к снижению. Таким образом, разработка новых средств борьбы с раком, несомненно, остаётся одной из самых острых проблем современной биологии, фундаментальной и практической медицины.

Начиная с 2013 г., в литературе появилось большое число работ, посвященных исследованию противоопухолевой и иммуномодулирующей активности субстанции никлозамид - 5-хлор-N-(2-хлор-4-нитрофенил)-2-гидроксибензамида, известной с 1956 г. и активно использующейся при изготовлении противогельминтных готовых лекарственных форм. В работе Al-Gareeb и соавт. (2018 г.) сообщается, что в настоящее время никлозамид проходит клинические испытания в качестве адьюванта для лечения ревматоидного артрита. Таким образом, диссертационная работа А.С. Жирника обладает очевидной актуальностью.

В качестве цели работы автор обозначил изучение противоопухолевой активности никлозамида в свободной и полимерной форме на культурах клеток человека и мыши и изучение его комбинированного и радиосенсибилизирующего действия. В задачу работы входило изучение противоопухолевой активности никлозамида *in vitro* в отношении нескольких перевиваемых линий рака прямой кишки в сравнении с эмбриональными линиями человека, которые диссертант рассматривал в качестве модели нормальных клеток человека. Особое внимание было удалено опухолевым линиям с множественной лекарственной устойчивостью, обусловленной гиперпродукцией белков MDR1 и Bcl2. С учётом низкой растворимости никлозамида в воде, автор выполнил исследование *in vitro* противоопухолевой эффективности наноструктурированной формы никлозамида, инкапсулированного в наночастицах на основе сополимера молочной и гликолевой кислот, полимерной субстанции Eudragit и поливинилового спирта, сопоставив её с активностью свободного никлозамида. В задачу работы входило изучение кинетики поглощения наноструктурированной формы никлозамида клетками линий колоректального рака. Было

исследовано сочетанное действие никлозамида с широко распространенным противоопухолевым средством алкилирующего действия – цисплатином. В заключение работы была исследована активность никлозамида в качестве радиосенсибилизатора, потенцирующего противоопухолевое действие гамма-излучения.

При постановке задач диссертант учитывал известные из литературы сведения о потенциальных молекулярных мишенях никлозамида: секреторном факторе Wnt, участвующем в стимулировании роста многих линий рака прямой кишки, компонентах сигнального каскада STAT, протеинкиназе mTOR, а также дыхательной цепи митохондрий. Обоснованию задач в этой части полностью посвящен обзор литературы, представленный в работе.

### **Степень достоверности результатов исследований, основных положений и заключений**

Достоверность результатов работы А.С. Жирника определяется существенным объёмом собственных исследований. Для решения поставленных задач автор использовал современные методы исследования противоопухолевых препаратов *in vitro*: МТТ-тест и проточную цитофлуориметрию в сочетании с грамотно подобранной панелью опухолевых линий рака прямой кишки. Достоверность исследования обусловлена адекватным использованием методов статистической обработки данных, используемых в токсикологических исследованиях *in vitro*. В частности, хорошее впечатление производит раздел, посвященный определению показателя аддитивности никлозамида с цисплатином по методу Chou-Talalay. О методической грамотности автора свидетельствует также творческое использование метода тушения флуоресценции ФИТЦ трипановым синим с целью определения доли никлозамид-содержащих наночастиц, проникших во внутреннее пространство клеток. Для решения этой методической задачи диссертант эффективно воспользовался методами статистической обработки данных с помощью программного обеспечения имевшегося в его распоряжении проточного цитофлуориметра.

Сформулированные цель и задачи работы представляются в целом достаточно обоснованными. Они полностью соответствуют современному уровню научных исследований в области применения никлозамида в качестве потенциального противоопухолевого средства. Использование современных методов исследования и компьютерной обработки данных, проведение экспериментальной работы на высоком методическом уровне позволило получить большой объём достоверных данных, необходимый для решения поставленных в работе задач.

Основные результаты работы были апробированы и представлены на международных конференциях, а также опубликованы в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ для защиты по специальности 03.01.04 «Биохимия».

## **Научная значимость, теоретическая и практическая ценность исследования**

Научная новизна и практическая значимость исследования состоит, прежде всего, в демонстрации перспективности дальнейшего исследования никлозамида в качестве кандидатного противоопухолевого средства. Испытанная диссидентом полимерная форма никлозамида является новой и существенно расширяет возможности практического применения никлозамида в качестве противоопухолевого химиопрепарата. Диссидентом собран большой массив данных о кинетике и концентрационных зависимостях действия никлозамида на клетки линий рака прямой кишки, что облегчает планирование дальнейших испытаний этой субстанции как в свободной, так и в полимерной форме.

Результаты исследования могут быть использованы в учебном процессе в рамках таких учебных дисциплин как «Биохимия», «Фармакология», «Молекулярная биология».

## **Общая характеристика, структура и оформление диссертации**

Диссертационная работа изложена на 140 страницах машинописного текста, иллюстрирована 22 рисунками и 5 таблицами. Работа построена по традиционному плану, содержит введение с формулировкой целей и задач исследования, обзор литературы, материалы и методы, результаты и их обсуждение, выводы, список литературы и приложения. Библиография включает 255 источников, среди которых 11 отечественных и 244 зарубежных источника. Автореферат оформлен в соответствии с существующими требованиями и полностью отражает содержание диссертации.

## **Пожелания, замечания, вопросы**

Несмотря на высокий научно-методический уровень проведённого исследования, подробное и логичное описание полученных результатов, качественное оформление иллюстративного материала, при чтении работы возникает ряд вопросов, требующих пояснения. В частности:

1. Формулируя цель работы, автор ограничился исследованиями никлозамида *in vitro* на клеточных линиях опухолей толстой кишки. Само по себе это решение является вполне правомерным. Однако, при планировании и выполнении экспериментов по исследованию противоопухолевых препаратов *in vitro* любому исследователю необходимо учитывать, что следующей стадией разработки нового метода терапии опухолей с помощью нового препарата будут исследования специфической фармацевтической активности и токсичности препаратов на животных. Эксперименты *in vitro* в этой цепочке неизбежно являются вспомогательными. Они призваны, в первую очередь, обеспечивать исходные данные для более сложных и дорогостоящих экспериментов *in vivo*. С учётом этого, при постановке задач исследования и написании литературного обзора диссиденту следовало

бы уделить большее внимание вопросам, связанным с исследованием действия никлозамида на организм животных в целом, в частности, его влияния на различные системы организма, и на механизмы детоксикации и экскреции этого вещества. Очевидно, что избирательность противоопухолевого действия любого действующего вещества зависит не только от его сродства к тем или иным макромолекулам в опухолевой клетке, но и от его биораспределения в организме, скорости снижения концентрации и наличия мишней в нормальных клетках. Эти вопросы были полностью упущены при написании литературного обзора, хотя в литературе имеется существенный массив необходимых данных. На практике, автору следовало бы учесть этот фактор при моделировании цитотоксического действия никлозамида, полимерной формы никлозамида и цисплатина на опухолевых линиях, снижая действующую концентрацию вещества примерно с той скоростью, как это происходит в организме животного. Например, кинетика выведения цисплатина распадается в 2 этапа: на первом время полувыведения составляет 25-50 мин, а на втором – 58-73 ч. Более 90% вещества связывается с белками и выводится из организма с мочой, а остальная часть оказывает цитотоксическое действие. Одновременно цисплатин биотрансформируется в печени, оказывая токсическое воздействие на клетки печени. Автор проводил инкубацию клеток с противоопухолевыми агентами в течение 72 часов, поддерживая концентрацию неизменной в течение этого срока. При этом установленная им  $IC_{50}$  цисплатина составила  $10,2 \pm 0,5$  мкМ. Между тем, инкубация тех же клеток с цисплатином в течение 3 часов с последующей сменой среды на чистую, не содержащую противоопухолевого агента, привела бы к увеличению измеряемой  $IC_{50}$  до 80-100 мкМ. Аналогичных данных по никлозамиду в литературе пока нет, и их получение в рамках диссертационной работы внесло бы существенный вклад в планирование экспериментов *in vivo*.

2. Особенno большое значение токсикологический аспект работы имеет применительно к полимерной форме никлозамида. Необходимо учитывать, что кажущееся снижение побочной токсичности наноструктурированных форм противоопухолевых средств нередко носит формальный характер, обусловленный тем, что токсическое действие наноструктурированных форм на организм в целом развивается в несколько раз медленнее, чем свободного действующего вещества, и в некоторых случаях не фиксируется в экспериментах по определению острой токсичности, если они выполняются в течение короткого времени. Однако, само по себе это наблюдение не означает, что последствия терапии для состояния здоровья пациента в целом окажутся менее тяжелыми, чем в случае свободного действующего вещества.

3. При составлении обзора литературы автору следовало бы уделить внимание изложению метаболизма фактора Wnt во внеклеточном пространстве. Из текста диссертации остается неясным, что является источником этого лиганда, обуславливающего

ускоренный рост опухолей, у пациентов с раком толстой кишки. Полностью не освещенным остался вопрос о транспорте и деградации этого фактора во внеклеточном пространстве в опухолевой ткани и в организме в целом. Внимание уделено лишь действию и метаболизации Wnt в пределах единичной опухолевой клетки после связывания лиганда с рецептором.

4. Выбор трансформированной эмбриональной линии фибробластов легких человека и линии HEK293 в качестве единственной модели нормальных тканей человека представляется недостаточным для заключения о высокой избирательности действия никлозамида. Автору целесообразно было бы существенно расширить совокупность объектов сравнения для формирования панели объектов, имитирующих организм человека в целом.

5. При составлении обзора литературы и выполнении экспериментов необходимо было бы уделить должное внимание имеющимся в литературе многочисленным данным об иммуномодулирующей активности никлозамида, которая может вносить существенный и даже решающий вклад в его наблюдаемую противоопухолевую активность *in vivo*. При проведении экспериментов целесообразно было бы запланировать и провести эксперименты по изучению влияния никлозамида на нормальные лимфоциты и опухолевые линии Т- и В-клеточного лейкоза.

6. При изучении радиосенсибилизирующей активности никлозамида целесообразно было бы использовать клоногенный тест, так как эффекты, возникающие в опухолевых клетках в результате воздействия гамма-излучения, развиваются в течение длительного времени и цитотоксический эффект повреждений ДНК не удается достоверно выявить другими способами.

В завершение необходимо подчеркнуть, что сделанные замечания и вопросы носят дискуссионный характер или касаются оформления. Они не снижают общей высокой оценки работы, которая вносит крупный вклад в представления научного сообщества о возможности дальнейших исследований никлозамида в качестве потенциального противоопухолевого средства. Оформление работы находится на высоком уровне. В отличие от многих других диссертационных работ, она практически свободна от опечаток.

## **Заключение**

Тема диссертационной работы является актуальной. Рецензируемая диссертационная работа Жирника Александра Сергеевича на тему «Исследование противоопухолевой активности никлозамида и комбинированных воздействий с его использованием» выполнена на высоком методическом уровне и является самостоятельным и законченным научно-квалификационным исследованием. Результаты работы опубликованы в высокорейтинговых

научных изданиях, в том числе, международных, рекомендованных ВАК РФ для защиты по специальности 03.01.04 «Биохимия».

Автор продемонстрировал, что является высококвалифицированным специалистом в области биохимии, владеющим современными методами эксперимента и обработки полученных данных и способным к самостоятельному решению сложных теоретических и научно-практических задач.

Таким образом, 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».

Старший научный сотрудник лаборатории  
Радионуклидных и лучевых технологий в  
экспериментальной онкологии ФГБУ  
«НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»  
Минздрава России,  
кандидат биологических наук  
по специальности 03.00.04 – «биохимия»



Позднякова Наталья Владимировна

Адрес: 115478, Российской Федерации, г. Москва, Каширское шоссе, д.24  
Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации  
Тел.: +7(903)282-29-82  
E-mail: natpo2002@mail.ru

Подпись к.б.н. Н.В. Поздняковой удостоверяю

Ученый секретарь НИИ Клинической и  
Экспериментальной Радиологии  
ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н.Блохина»  
Минздрава России, доктор медицинских наук



Ю.В. Буйденок

08 мая 2019 г.