

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель генерального директора
ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России
доктор медицинских наук, профессор

«22» 09 2019 г.
А.А. Костин



ОТЗЫВ

ведущей организации - Московского научно-исследовательского онкологического института имени П.А. Герцена – филиала Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации - о научной и практической ценности диссертационной работы Жирника Александра Сергеевича «Исследование противоопухолевой активности никлозамида и комбинированных воздействий с его использованием», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – «биохимия».

Актуальность темы диссертации

Диссертационная работа Жирника А.С. «Исследование противоопухолевой активности никлозамида и комбинированных воздействий с его использованием» направлена на изучение цитотоксической и радиосенсибилизирующей активности никлозамида в свободной и полимерной форме в отношении культивируемых клеток различных опухолевых линий и механизмов, лежащих в её основе. Актуальность данной работы обусловлена рядом причин. Во-первых, активно развивающимся в настоящее время направлением разработки новых лекарственных средств, позволяющих расширить возможности терапии злокачественных новообразований, является поиск противоопухолевой активности у разрешенных к медицинскому применению лекарственных веществ. К их числу относится выбранный диссидентом в качестве объекта исследования антигельминтный препарат никлозамид. Во-вторых, для повышения эффективности и избирательности действия этого препарата автором выбран перспективный подход, заключающийся в использовании никлозамида в составе полимерной композиции в виде субмикронных частиц. В-третьих, проведенное исследование направлено на изучение молекулярных механизмов цитотоксического и радиосенсибилизирующего действия никлозамида.

Научная новизна исследования и полученных результатов

Соискатель получил ряд оригинальных результатов, важных как с теоретической, так и с прикладной точки зрения. Так, обнаружена чувствительность к никлозамиду клеток меланомы и колоректального рака человека с высоким уровнем экспрессии белков MDR1 и Bcl-2, которые определяют их устойчивость к традиционным противоопухолевым воздействиям. Показано, что использование никлозамида в составе полимерных частиц на основе сopolимера молочной и гликолевой кислот приводит к повышению эффективности его действия на опухолевые клетки. При этом установлено, что молекулярный механизм действия никлозамида в свободной и полимерной форме в клетках колоректального рака человека сходен и связан с повреждением митохондрий, развитием окислительного стресса и блоком клеточного цикла в G₁-фазе. Показано увеличение эффективности цитотоксического действия никлозамида в свободной и полимерной форме и цисплатина в отношении опухолевых клеток меланомы линии B16 при их комбинированном применении в сравнении с каждым из препаратов по отдельности. Обнаружено радиосенсибилизирующее действие никлозамида в отношении клеток колоректального рака человека, связанное с ингибированием репарации двунитевых разрывов ДНК.

Структура и основное содержание диссертации

Диссертация имеет традиционную структуру и изложена на 140 страницах машинописного текста, содержит 22 рисунка и 5 таблиц. Работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы, включающего 255 источников, благодарностей и двух приложений.

В «Введении» отражены актуальность темы исследования и степень её разработанности, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, сформулированы цель и задачи исследования, основные положения, выносимые на защиту, кратко описаны методология и методы исследования. В данном разделе также представлены сведения об апробации и внедрении результатов и основных публикациях по теме исследования.

В главе «Обзор литературы» автором приведены общие сведения об истории открытия никлозамида, его физико-химических свойствах и видах биологической активности, описано действие никлозамида на нормальные клетки. Подробно описаны молекулярные механизмы цитотоксического действия никлозамида в отношении опухолевых клеток, связанные с влиянием препарата на активность целого ряда сигнальных путей и функции митохондрий. Детально проанализированы имеющиеся

данные литературы по эффективности противоопухолевого действия никлозамида в экспериментах *in vivo* и возможности его комбинированного использования с известными химиотерапевтическими препаратами и ионизирующим излучением.

В главе «Материалы и методы» диссертантом приведен перечень использованных реагентов, подробно описаны примененные современные клеточные, биохимические и иммунохимические методы, методы статистической обработки полученных данных. Материалы и методы написаны подробно и позволяют воспроизвести результаты экспериментов.

В главе «Результаты и обсуждение» представлены результаты собственных исследований автора и их обсуждение. При анализе выживаемости различных линий опухолевых и нормальных клеток после инкубации с никлозамидом обнаружено избирательное действие препарата в отношении опухолевых клеток, значение IC_{50} для которых составило 1–2 мкМ, в то время как для нормальных – 10–20 мкМ. При этом важной характеристикой никлозамида является то, что данный препарат эффективен в отношении опухолевых клеток с высоким уровнем экспрессии белков MDR1 и Bcl-2, определяющих их высокую устойчивость к повреждающим воздействиям. Показано, что повышение избирательности действия никлозамида на опухолевые клетки может быть достигнуто при использовании препарата в виде полимерных частиц, полученных на основе биосовместимого биодеградируемого сopolимера молочной и гликолевой кислот. Результаты серии экспериментов по изучению накопления схожих по составу полимерных частиц, меченых флуоресцеин-5-изотиоцианатом, в клетках двух линий колоректального рака человека указывают на то, что более высокая активность никлозамида в виде полимерной формы может быть связана с эффективной интернализацией полимерных частиц опухолевыми клетками.

При исследовании молекулярного механизма цитотоксического действия никлозамида в свободной и полимерной форме диссертантом было обнаружено повреждение митохондрий (оцениваемое по снижению уровня накопления флуоресцентного красителя родамина-123), увеличение содержания активных форм кислорода и митохондриального супероксиданион-радикала, увеличение доли клеток в G₁-фазе после инкубации опухолевых клеток с препаратом в концентрации, близкой к IC_{50} ; все обнаруженные изменения были более интенсивными при использовании никлозамида в виде полимерных частиц. На основе полученных данных сделан обоснованный вывод о том, что основной механизм действия никлозамида связан с повреждением митохондрий опухолевых клеток. Жирником А.С. была изучена возможность комбинированного применения никлозамида с алкилирующим агентом из

группы соединений платины цисплатином. В ходе детального исследования с использованием разных экспериментальных условий (концентраций препаратов, их соотношения) была обнаружена высокая эффективность комбинированного действия никлозамида в свободной и полимерной форме и цисплатина в отношении клеток меланомы мыши. Полуколичественная оценка характера взаимодействия препаратов в комбинации, выполненная методом Chou-Talalay, свидетельствует об аддитивности и синергизме действия никлозамида в свободной форме и в форме полимерных частиц и цисплатина, соответственно, причем сила взаимодействия зависит от соотношения концентраций препаратов.

В заключительном разделе главы приведены результаты исследования эффективности совместного действия никлозамида и γ -излучения. Обнаружена более интенсивная гибель клеток аденокарциномы прямой кишки человека линии SW837 и карциномы сигмовидной кишки человека линии COLO 320 HSR при комбинированном использовании никлозамида и облучения, чем при воздействии каждого из этих факторов по отдельности. Установлено, что повышение радиочувствительности опухолевых клеток обеих линий связано с ингибированием reparации двунитевых разрывов ДНК под действием никлозамида; в некоторых случаях оно сопровождается снижением уровня β -катенина.

Достоверность полученных результатов обеспечивается проведением необходимого количества повторных испытаний, статистической обработкой данных с заданной вероятностью и сопоставлением полученных результатов с аналогичными результатами других авторов.

В «Заключении» обсуждаются основные результаты работы. Выводы, представленные автором диссертации, полностью соответствуют задачам и результатам, полученным при проведении научно-исследовательской работы.

В диссертации имеются приложения. В приложении 1 приведена таблица, содержащая около 350 значений IC₅₀ никлозамида для разных линий опухолевых и нормальных клеток человека и лабораторных животных. Содержащиеся в ней данные обладают высокой информационной ценностью. В приложении 2 представлена копия патента на изобретение полимерной формы никлозамида.

Основное содержание диссертации представлено в 12 публикациях, в том числе в 4 статьях в журналах, входящих в перечень рецензируемых научных журналов и изданий для опубликования основных научных результатов диссертаций, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России. Автореферат и публикации в полной мере отражают содержание диссертации.

Научно-практическая значимость полученных результатов, рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации

Автором диссертации установлен молекулярный механизм цитотоксического действия никлозамида на клетки колоректального рака человека, связанный с повреждением митохондрий, что отличает данный препарат от традиционно используемых химиотерапевтических средств. Важное теоретическое значение также имеют данные о механизме радиосенсибилизирующего действия никлозамида, заключающегося в ингибировании reparации двунитевых разрывов ДНК в опухолевых клетках после γ -облучения. Высокой практической ценностью обладают сведения об эффективности действия никлозамида в свободной и полимерной форме в отношении клеток колоректального рака человека с высоким уровнем экспрессии белка MDR1. Результаты исследования противоопухолевой активности никлозамида при его совместном применении как с цисплатином, так и с облучением свидетельствуют о возможности использования данного препарата в комбинированной терапии злокачественных новообразований.

Таким образом, результаты работы могут быть использованы в соответствующих исследованиях в научных учреждениях биомедицинского профиля, таких как ФГБУН Институт физиологически активных веществ РАН, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, ФГБУ «Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба» Минздрава России, ФГБУ «Научно-исследовательский институт онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, и в преподавании биомедицинских дисциплин в российских университетах.

Замечания и предложения

Принципиальных замечаний по работе нет.

Заключение

Диссертационная работа Жирника Александра Сергеевича «Исследование противоопухолевой активности никлозамида и комбинированных воздействий с его использованием» является оригинальным, самостоятельно выполненным, законченным научным трудом, который имеет большое научное и практическое значение для клеточной биологии и экспериментальной онкологии. Тема диссертации актуальна, результаты имеют существенную новизну, основные выводы достоверны. По совокупности полученных результатов работа Жирника Александра Сергеевича соответствует п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842 (в ред. Постановления Правительства РФ от

01.10.2018 № 1168). Автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – «биохимия».

Отзыв утвержден и одобрен на объединенной научной конференции сотрудниками отделения «Прогноза эффективности консервативного лечения» и отделения «Модификаторов и протекторов противоопухолевой терапии» Московского научно-исследовательского онкологического института имени П.А. Герцена – филиал Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации (протокол № 5 от 12 апреля 2019 г.).

Заведующий отделением
«Прогноза эффективности консервативного лечения»
МНИОИ им. П.А. Герцена – филиала
ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России,
доктор биологических наук по специальности
14.01.12 – «онкология», профессор

Согласна на сбор, обработку, хранение
и передачу персональных данных.

Наталья Сергеевна Сергеева

Подпись д.б.н., проф. Натальи Сергеевны Сергеевой
«Заверяю»

Ученый секретарь
МНИОИ им. П.А. Герцена – филиала
ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России

Елена Петровна Жарова

Адрес: 125284, г. Москва, 2-й Боткинский пр., д. 3
Московский научно-исследовательский онкологический институт имени П.А. Герцена – филиал Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Тел.: +7(495)945-74-15, +7(495)945-19-35

E-mail: prognoz.06@mail.ru

Сайт: <https://www.mnioi.nmicr.ru>