

«УТВЕРЖДАЮ»

Проректор по научной работе ФГБОУ ВО  
«Первый Санкт-Петербургский  
государственный медицинский  
университет имени акад. И.П. Павлова»  
Министерства здравоохранения

Российской Федерации

академик РАН, д.м.н., профессор

Ю. С. Полушин

9 января 2023 года



### ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

о научно-практической значимости диссертационной работы Цымбала Сергея Алексеевича на тему: «Механизмы гибели опухолевых клеток при комбинировании медьсодержащих и тиоловых соединений», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности: 1.5.4. Биохимия.

#### Актуальность темы исследования

Формирование лекарственной устойчивости — одна из важнейших проблем при химиотерапии опухолей. Различные механизмы позволяют злокачественным клеткам не только избегать действия химиопрепаратов, но и давать начало рецидиву, ухудшая результаты лечения и прогноз для пациентов. В настоящее время доступно множество подходов к борьбе с устойчивостью, например, модификация структуры лекарственного средства, комбинированная терапия с использованием нескольких препаратов, адресная доставка наночастицами, однако проблема остается нерешённой, что во многих случаях связано с блокированием механизмов апоптоза.



Оксидативная терапия использует активные формы кислорода (АФК) для элиминации опухолевых клеток. Такое воздействие способно запускать механизмы регулируемой клеточной гибели, отличные от апоптоза, и оказывает негативное влияние в том числе на опухолевую нишу, снижая способность опухоль-ассоциированных фибробластов поддерживать жизнеспособность опухоли. При терминальной стадии заболевания и в условиях сформированной лекарственной устойчивости именно оксидативная терапия может дать положительный результат, так как опухолевые и ассоциированные с ними клетки имеют ряд черт, обуславливающих их восприимчивость к такому воздействию. АФК могут продуцироваться довольно широким спектром соединений, включая медьсодержащие. Органические комплексы и наночастицы (НЧ) на основе меди рассматриваются как перспективные противоопухолевые препараты, сравнимые с соединениями цисплатинового ряда. Цитотоксичность меди может модулироваться различными органическими молекулами, такими как антиоксиданты, но эти взаимодействия недостаточно изучены. Витамин Е снижает медь-опосредованную токсичность, в то время как витамин С может выступать в роли прооксиданта или антиоксиданта в зависимости от концентрации. Взаимодействие меди и гомоцистеина приводит к увеличению внутриклеточного уровня пероксида водорода и развитию нейротоксичности. Результат взаимодействия соединений остаётся неясен.

Таким образом, представленная диссертационная работа представляет собой актуальное исследование и направлена на установление механизмов усиления цитотоксичности медьсодержащих соединений в присутствии органических восстановителей для индукции гибели опухолевых клеток — родительских и изогенных сублиний с лекарственной устойчивостью.

### **Научная новизна исследования**

Впервые показано, что эффект взаимодействия с восстановителями специфичен для соединений меди(II) в разных контекстах: наночастицы  $\text{CuO}$ ,



растворимая соль или металлоорганический комплекс. Помимо соединений, содержащих тиольную группу, восстанавливать двухвалентную медь способны другие агенты, например, аскорбиновая кислота. Другие переходные металлы не взаимодействуют с указанными восстановителями. Впервые показано протекание гибели клеток без активации классических механизмов апоптоза, что расширяет терапевтический потенциал комбинаций. Впервые показана возможность снижения опухолевой нагрузки у лабораторных мышей-опухоленосителей при введении комбинации медьорганического соединения и восстановителя.

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Достоверность полученных результатов основана на использовании комплекса современных методов исследования и статистической обработке результатов экспериментов. Результаты исследований, представленные в работе, получены на современном оборудовании с использованием общепринятых биологических моделей и протоколов. Материалы диссертационной работы были опубликованы в виде трёх статей в рецензируемых международных журналах и представлены в виде докладов на 15 конференциях всероссийского и международного уровней. Результаты исследования были также оформлены в виде патента на изобретение № 2721771 «Применение композиции наночастиц оксида меди и *N*-ацетилцистеина для индукции гибели клеток хронического миелоидного лейкоза», Роспатент.

### **Теоретическая и практическая значимость исследования**

Общебиологическая значимость работы заключается в установлении механизма повышения цитотоксичности медьсодержащих соединений (наночастиц и органических комплексов) в комбинации с органическими восстановителями, в том числе физиологическими (цистеин, аскорбат).



Генерируемый комбинацией окислительный «взрыв» приводит к гибели родительских и резистентных клеток без активации апоптоза.

### **Оценка содержания диссертации**

Диссертация состоит из введения, четырёх глав с описанием исследований (обзор литературы, материалы и методы, результаты исследования и обсуждение), заключения, выводов и списка литературы. Текст работы изложен на 125 страницах, включает 42 изображения и шесть таблиц. Список литературы содержит 168 источников на русском и английском языках.

В первой главе приводится обзор литературы. Рассматривается феномен лекарственной устойчивости опухолевых клеток, механизмы её формирования и возможные способы борьбы с резистентными опухолями. Перечисляются основные механизмы гибели опухолевых клеток, отличия в их молекулярно-биологической реализации и участие в становлении устойчивости. Приводится информация о том, насколько полезной в борьбе с резистентными опухолями может в этом контексте оказаться оксидативная терапия. Перечисляются фармакологические препараты, терапевтический эффект которых реализуется за счёт воздействия на внутриклеточную систему перераспределения меди. Обсуждается эффективность таких веществ и возможное будущее развитие области.

Методическая часть работы адекватна поставленным задачам и проведена на высоком уровне. Для решения поставленных задач были использованы культуральные, морфологические, биохимические методы, проточная цитофлюорометрия, иммуноблоттинг и др., а также методы статистической обработки. В качестве объектов исследования в представленной работе были использованы клетки хронического миелоидного лейкоза (ХМЛ) человека (K562), трижды негативной карциномы молочной железы (MDA-MB-231) и аденокарциномы толстой кишки (HCT116), которые были получены из Американской коллекции типовых культур. Линии В16-F10



(меланома мышцы), K562/4 (сублиния с гиперэкспрессией гена MDR 1/P-гликопротеина) и псевдонормальные фибробласты ПФЧ. В экспериментах использовались клетки в логарифмической фазе роста.

В разделе результатов и их обсуждения автор анализирует полученные данные в сопоставлении со сведениями, представленными в современных публикациях других исследователей.

Одним из основных ограничений эффективности химиотерапии опухолей является лекарственная устойчивость. Клетки, выжившие после неоднократных токсических воздействий, существенно отличаются от исходных. Особенно важно, что в таких клетках не функционируют апоптотические каскады: метаболическое перепрограммирование даёт селективное преимущество в выживании. Разработка подходов к преодолению лекарственной устойчивости требует выявления молекулярных механизмов гибели, сохранившихся в резистентных клетках. Помимо апоптоза есть ряд других механизмов регулируемой клеточной гибели, многие из которых индуцируются повышением внутриклеточных АФК, нарушением баланса в метаболизме металлов или первичным повреждением плазматической мембраны. Правомерно предположить, что при блокировании апоптотических сигналов именно такие воздействия окажутся терапевтической альтернативой.

В настоящей работе исследованы биохимические механизмы гибели опухолевых клеток посредством смещения редокс-баланса в сторону окисления при восстановлении катионов меди(II). Установлено значительное (до трёх порядков по соотношению 50 %-х рост-ингибирующих концентраций) увеличение цитотоксичности медьсодержащих соединений — неорганических (НЧ оксида, соли) и в составе сложных органических комплексов — при их комбинировании с НАС или аскорбатом. Отдельные компоненты комбинации использовали в нетоксичных концентрациях. Повышение чувствительности клеток достигнуто независимо от тканевой принадлежности. Особенно важно, что указанный эффект сохраняется в



клетках с лекарственной устойчивостью. Выявленные закономерности выполняются только для соединений меди(II); другие переходные металлы неактивны в комбинациях с восстановителями. При анализе молекулярных событий в ответ на комбинации выявлено довольно быстрое — в первые часы воздействия — нарушение целостности плазматической мембраны для молекул типа пропидия иодида (маркер некроза). Механизм гибели клеток сложный: признаки, характерные для апоптоза (Аннексин V-позитивность, снижение электрического потенциала митохондрий), сочетаются с некротическим нарушением целостности плазматической и других мембран. Именно этот признак является решающим: окислительное повреждение плазматической мембраны нерепарируемо (летально). Из-за быстроты его развития другие процессы, сопровождающие гибель, не успевают реализоваться. Клетки с лекарственной устойчивостью оказываются чувствительны к АФК-индуцируемому некрозу. Таким образом, мембраны — мишени терапевтических воздействий для элиминации таких клеток. Исследование противоопухолевой эффективности *in vivo* позволяет считать комбинацию перспективной. Выявлено статистически достоверное торможение роста опухоли, сравнимое с эффективностью клинического препарата. Эффективность АФК-генерируемой гибели клеток можно увеличивать, оптимизируя структуру медьсодержащих соединений и режимы введения комбинаций. В целом, диссертация производит исключительно положительное впечатление. Выводы в работе чётко сформулированы и соответствуют поставленной цели и задачам.

При детальном изучении диссертационного исследования возникли следующие вопросы и замечания.

1. Чем был обусловлен выбор структур комплексов и какими физико-химическими методами доказывались их структуры?
2. Почему не рассматривалась возможность образования медного комплекса с самим ацетилцистеином?



3. Какие взаимодействия лежат в основе образования наночастиц оксида меди(II)?

4. Как можно соотнести наблюдения, показывающие, что генерация АФК происходит во внеклеточном пространстве, и последующие данные с маркером, показывающим продукцию АФК в клетке?

5. Проводились ли исследования по изучению влияния ацетилцистеина на эффективность цисплатина? Может ли у цисплатина иметься дополнительный механизм действия, сходный с описанным в диссертационной работе?

6. Существует две парадигмы о роли АФК в выживании опухолевых клеток. К какой из них соотносится данное диссертационное исследование?

7. Изучалось ли изменение размера частиц при варьировании концентраций и при добавлении аминокислот? Каким образом меняется размер частиц при их добавлении в такие многокомпонентные системы, как питательная среда для клеток?

8. Каким образом оценивалась устойчивость дисперсий наночастиц?

### **Замечания**

1. В графиках по цитотоксичности точки соединены линиями. Какой это имеет физический смысл?

2. Представлены названия комплексов, но нет данных по их характеристике и чистоте.

3. Нет описания методики изучения наночастиц на сканирующем микроскопе.

4. Отсутствует описание методик изучения координационных соединений методом циклической вольтамперометрии и вращающегося дискового электрода.

5. На стр. 43 на Рис. 4 оси подписаны на английском языке.

6. Также встречается некорректное употребление терминов, например, «определение характеристик координационных комплексов».



Других принципиальных замечаний по существу и оформлению диссертационной работы нет. Перечисленные выше вопросы и замечания не влияют на основные выводы и защищаемые положения диссертации С. А. Цымбала.

### **Рекомендации о практическом применении результатов диссертационного исследования**

Полученные результаты диссертационного исследования могут быть использованы для разработки рациональной высокоэффективной стратегии борьбы с лекарственной устойчивостью опухолей, в особенности при терминальной фазе заболевания, когда возможности апоптогенной терапии исчерпаны.

### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Диссертационная работа Цымбала Сергея Алексеевича на тему: «Механизмы гибели опухолевых клеток при комбинировании медьсодержащих и тиоловых соединений», является научно-квалификационной работой в которой на основании выполненных автором исследований решена научная задача по выявлению биохимических и молекулярно-клеточных особенностей реализации цитотоксического эффекта комбинацией различных медьсодержащих и тиоловых соединений в отношении опухолевых клеток дикого типа и с признаками сформированной лекарственной устойчивости.

Таким образом, по своей актуальности, научной новизне, практической значимости и достоверности полученных результатов, а также объему и уровню проведенного исследования диссертация полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», от 24.09.2013 г., № 842 (с изменениями от 18.03.2023 г., № 415) утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации предъявляемым к



диссертациям на соискание ученой степени, а её автор Цымбала Сергей Алексеевич заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности: 1.5.4. Биохимия.

Отзыв обсужден и одобрен на заседании кафедры общей и биоорганической химии ФГБОУ ВО «ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России, протокол № 03 от 07 декабря 2023 года.

Заведующий кафедрой общей и  
биоорганической химии ФГБОУ ВО  
«ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова»  
Минздрава России

доктор химических наук, доцент

К. Н. Семёнов

Профессор кафедры общей и биоорганической  
химии ФГБОУ ВО «ПСПбГМУ им. акад. И. П. Павлова»  
Минздрава России

доктор биологических наук, доцент

В. В. Шаройко

197022, Российская Федерация, г. Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6-8,  
тел. 8(812) 338-78-95, e-mail: info@1spbgmu.ru; https://www.1spbgmu.ru/ru/

