

## ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора медицинских наук, доцента,  
профессора кафедры фармакологии федерального государственного  
бюджетного образовательного учреждения высшего образования  
«Рязанский государственный медицинский университет имени академика  
И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации  
Щулькина Алексея Владимировича на диссертацию  
Цымбала Сергея Алексеевича на тему: «Механизмы гибели опухолевых  
клеток при комбинировании медьсодержащих и тиоловых соединений»  
на соискание ученой степени кандидата биологических наук  
по специальности 1.5.4. Биохимия

### Актуальность темы

По прогнозам Международного агентства по изучению рака ожидается, что рак станет основной причиной смертности населения в каждой стране мира в XXI веке. Поэтому разработка новых, более эффективных подходов к лечению онкологических заболеваний представляет наиболее обширную и быстроразвивающуюся область медицины.

Особую проблему представляет лекарственная устойчивость опухолевых клеток, которая развивается вследствие различных механизмов: блокирования апоптоза, гиперэкспрессии эффлюксных белков множественной лекарственной устойчивости и ферментов метаболизма, модификации мишеней для воздействия цитостатиков и ряд других. Для борьбы с данными типами опухолевых клеток нужны новые подходы и мишени для терапевтического воздействия.

Органические комплексы и наночастицы (НЧ) на основе меди рассматриваются как перспективные противоопухолевые препараты, сравнимые с соединениями цисплатинового ряда.

В ряде исследований было предположено, что восстановители, например ацетилцистеин, могут усилить противоопухолевую активность данных соединений. Однако, биохимические механизмы данного явления не известны.

Все вышеизложенное и послужило предпосылкой для формирования С.А. Цымбалом следующей фундаментальной проблемы: изучить молекулярно-биологические и биохимические механизмы гибели опухолевых клеток при



воздействии комбинации соединений меди и восстановителей на примере ацетилцистеина.

Таким образом, тема диссертационного исследования Цымбал С.А. является актуальной.

Принимая во внимание перспективность изучения подобных вопросов автор четко обозначает цель диссертационного исследования - установить биохимические механизмы цитотоксичности комбинаций медьсодержащих соединений и восстановителей (N-ацетилцистеин, аскорбат) для опухолевых клеток человека и трансплантированной опухоли у лабораторных мышей.

#### **Научная новизна исследования и полученных результатов**

Диссертационная работа Цымбала С.А. обладает высокой научной новизной. В работе впервые показан эффект специфического взаимодействия восстановителей с соединениями меди (II), сопровождающийся усилением цитотоксичности последних. Причем доказано, что помимо соединений, содержащих тиольную группу, восстанавливать двухвалентную медь и таким образом усиливать ее токсичность могут и другие агенты, например, аскорбиновая кислота. С другой стороны, другие переходные металлы такое действие, в отличие от меди, не оказывают.

В диссертационной работе впервые установлен биохимический механизм гибели клеток под действием комбинации медьсодержащих соединений и ацетилцистеина, который заключается в активации свободнорадикального окисления и развитии некроза без вовлечения в процесс апоптоза.

В исследовании *in vivo* впервые доказана возможность снижения опухолевой нагрузки у лабораторных мышей-опухоленосителей при применении тестируемой комбинации веществ.

#### **Научная и практическая значимость полученных результатов**

Общебиологическая научная значимость работы заключается в установлении способности медьсодержащих соединений в комбинации с органическими восстановителями (ацетилцистеином, аскорбатом) вызывать развитие окислительного стресса и усиливать таким образом цитотоксичность



металлокомплексов. Установлен биохимический механизм противоопухолевой активности тестируемой комбинации, который заключается в индукции некроза резистентных к химиотерапии опухолевых клеток без индукции апоптоза.

С другой стороны, выявленная противоопухолевая активность комбинации медьсодержащих соединений и ацетилцистеина, не уступающая классическим противоопухолевым средствам, может лечь в основу новой высокоэффективной стратегии борьбы с лекарственной устойчивостью опухолей, в особенности при терминальной фазе заболевания, когда возможности апоптогенной терапии исчерпаны.

### **Содержание работы, ее завершенность и оформление**

Диссертационная работа построена традиционно и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов исследования, их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Текст работы изложен на 125 страницах, включает 42 рисунка и 6 таблиц. Список литературы содержит 168 источников.

Во введении автор последовательно и подробно раскрывает актуальность темы исследования, формулирует его цель и задачи, описывает научную новизну, теоретическую и практическую значимость работы, методы исследования, представляет основные положения, выносимые на защиту, степень достоверности и сведения об апробации полученных результатов.

В обзоре литературы Цымбал С.А. грамотно излагает данные о молекулярных механизмах лекарственной устойчивости и гибели клеток, об активных формах кислорода в норме и при патологии, а также приводит примеры применения медьсодержащих соединений в противоопухолевой терапии. Стиль изложения и характер анализируемых литературных данных демонстрирует высокую квалификацию диссертанта.

Глава «Материалы и методы» исследования посвящена описанию объектов и методов исследования. Диссертационная работа выполнена на высоком методическом уровне с применением современных и разнообразных биохимических методов, позволяющих полностью решить поставленные задачи:



проточная цитофлуориметрия, конфокальная микроскопия, иммуноблоттинг, атомно-абсорбционная спектроскопия. Отдельный раздел посвящен экспериментам с искусственными мембранами.

Данные по противоопухолевой активности комбинации медьсодержащих соединений и ацетилцистеина, полученные *in vitro*, были проверены и в опытах *in vivo* на модели асцитной опухоли Эрлиха у мышей BALB/c. Протоколы описаны детально с уточнением всех условий проведения экспериментов. Методы статистического анализа являются адекватными.

Результаты собственных исследований представлены в главе 3. Достоинством данного раздела является логичность и последовательность изложения материала. На основании полученных результатов делаются промежуточные выводы и обосновываются дальнейшие эксперименты.

Сначала автор подробно описывает получение медьсодержащих соединений и их стандартизацию.

На следующем этапе исследования оценивалась цитотоксичность комбинации соединений меди и ацетилцистеина, которая сравнивалась с активностью изолированных веществ. Диссертантом было показано усиление цитотоксичности соединений меди при комбинации с восстановителями, например ацетилцистеином.

Затем было доказано, что реакция между соединениями меди и ацетилцистеином является специфичной и не воспроизводится с другими ионами металлов переменной валентности, например цинка и железа.

Следующий блок экспериментов было посвящен изучению биохимических механизмов токсичности изучаемой комбинации.

С помощью разнообразных методов (проточной цитометрии, иммуноблоттинга, иммуноцитохимии, конфокальной микроскопии) было установлено, что комбинация соединений меди и ацетилцистеина приводит к генерации активных форм кислорода, что вызывает развитие некроза, без активации апоптоза, некроптоза и ферроптоза.



Дополнительно автором было выявлено, что комплексы меди плохо проникают внутрь клеток, поэтому инициация развития окислительного стресса происходит вне клеток.

В завершении блока исследований *in vitro* было доказано восстановление  $\text{Cu}^{2+}$  до  $\text{Cu}^+$  в присутствии ацетилцистеина.

Несомненным достоинством работы является выполнение исследований не только *in vitro*, но и *in vivo*. Вначале были подобраны безопасные дозы комбинации медьсодержащего соединения и ацетилцистеина, а затем была доказана возможность снижения опухолевой нагрузки у лабораторных мышей-опухоленосителей при применении тестируемой комбинации веществ.

В главе 4 автор проводит всестороннее обсуждение полученных результатов с учетом данных современной периодической литературы. Проведенный глубокий анализ позволяет в заключении подвести итог, что в ходе исследования доказана высокая противоопухолевая эффективность комбинации медьсодержащих соединений и восстановителей, которая может рассматриваться в качестве средства терапии фармакорезистентных опухолей, с локальными полостными метастазами.

На основании полученных результатов и обсуждения сформулированы 5 выводов, которые базируются на достоверном фактическом материале, мощной экспериментальной базе, адекватной статистической обработке. Выводы вытекают из полученных результатов и в полном объеме соответствуют поставленным задачам.

Список литературы полон и содержит источники последних лет.

Таким образом, С.А. Цымбал выполнил современное исследование в области биологической химии. Уровень диссертационной работы высокий. Ценность полученных результатов состоит в установлении биохимических механизмов цитотоксичности комбинаций медьсодержащих соединений и восстановителей (N-ацетилцистеин, аскорбат) для опухолевых клеток человека и трансплантированной опухоли у лабораторных мышей, и возможности их использования в терапевтической практике.



Содержание автореферата в полной мере отражает основные положения диссертации. Материалы диссертации в полной мере опубликованы в 18 печатных работах, в том числе в 3 статьях в журналах, индексируемых в базах данных Scopus и Web of Science. Получен патент Российской Федерации на изобретение «Применение композиции наночастиц оксида меди и N-ацетилцистеина для индукции гибели клеток хронического миелоидного лейкоза». Результаты работы представлены в виде устных и постерных докладов на 15 конференциях всероссийского и международного уровня.

В ходе ознакомления с работой возник ряд принципиальных замечаний:

1. Отсутствует список сокращений.
2. Встречаются неточности и опечатки, стилистические ошибки.
3. Во вступлении отсутствуют ссылки на источники литературы.

При прочтении работы также возникли некоторые вопросы:

1. Могут ли SH-группы в молекуле ацетилцистеина непосредственно взаимодействовать с ионами меди с образованием связи S-Cu? Может ли ион меди взаимодействовать с атомом азота в молекуле ацетилцистеина?
2. Как подбиралось соотношение ацетилцистеина и медь-содержащих соединений?
3. Если наночастицы содержащие медь плохо проникают внутрь клеток, гиперпродукция свободных радикалов происходит вне клетки, как вы можете объяснить изменение мембранного потенциала митохондрий?
4. Как было установлено в вашем исследовании, основной механизм противоопухолевой активности комбинации ацетилцистеина и медь-содержащих соединений связан с гиперпродукцией свободных радикалов во внеклеточной среде с последующим повреждением клеток и развитием некроза. Насколько перспективен данный подход, если он вызовет повреждение и нормальных тканей организма?

### **Заключение**

Таким образом, диссертация Цымбала Сергея Алексеевича «Механизмы гибели опухолевых клеток при комбинировании медьсодержащих и тиоловых

соединений» является завершенной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение научной задачи: установление биохимических механизмов противоопухолевой активности медьсодержащих и тиоловых соединений, имеющей важное значение для биохимии, что соответствует требованиям п.9 «Положения о присуждении ученых степеней» от 24.09.2013 № 842, утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации, а ее автор, Цымбал Сергей Алексеевич, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

Официальный оппонент:

профессор кафедры фармакологии  
ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России,  
доктор медицинских наук (14.03.06 – Фармакология, клиническая  
фармакология), доцент

  
Алексей Владимирович Шулькин

05.12.2023

Подпись д.м.н., доцента Шулькина А.В. заверяю:  
проректор по научной работе и инновационному развитию  
ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России,  
д.м.н., профессор

  
И.А. Сужков  


Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации  
Адрес: 390026 г. Рязань, ул. Высоковольтная, д. 9  
Тел: +7 4912 971801  
Адреса электронной почты: [rzgmu@rzgmu.ru](mailto:rzgmu@rzgmu.ru)  
Официальный сайт <https://www.rzgmu.ru>