

ОТЗЫВ

официального оппонента д.б.н., гл.н.с. ИБХФ РАН

Островской Ларисы Анатольевны

на диссертационную работу Або Кура Луай

«Механизм действия и противоопухолевая активность фармакологических пар *Clostridium novyi* C115H метионин–гамма-лиазы и сульфоксидов S-алкил-замещенного L-цистеина»,

представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям «1.5.4. Биохимия», «3.1.6. Онкология, лучевая терапия»

Рецензируемая диссертационная работа посвящена доклиническому исследованию противоопухолевой активности и механизма действия фармакологических пар, включающих фермент-*Clostridium novyi* C115H метионин–гамма-лиаза и пролекарства на основе сульфоксидов S-алкил-замещенного L-цистеина.

АКТУАЛЬНОСТЬ ТЕМЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Очевидная и несомненная актуальность темы исследования, предпринятого диссертантом, определяется необходимостью совершенствования методов лекарственной терапии опухолевых заболеваний.

Диссертация Або Кура Луай выполнена в рамках нового и активно развивающегося в последние годы направления исследований в онкологии, связанного с разработкой так называемых «фармакологических пар» веществ, состоящих из неактивного *in vitro* пролекарства и фермента, активирующего это пролекарство в условиях организма.

Согласно современным представлениям такой подход к созданию новых средств лекарственной терапии опухолевых заболеваний, подразумевающий адресное воздействие на опухолевые клетки, способен обеспечить большую избирательность действия противоопухолевых препаратов за счёт повышения их активности и снижения токсичности.

Основная идея такого подхода состоит в избирательном превращении в опухолевых клетках нетоксичного пролекарства в активный препарат под влиянием специфического фермента, что и обеспечивает достижение высоких локальных концентраций лекарства в опухолевых клетках.

Выбор темы исследования и её актуальность убедительно обоснованы анализом современных теоретических и экспериментальных данных об использовании пролекарств и фармакологических пар в онкологии, обобщённых в представленном автором литературном обзоре.

Необходимо специально подчеркнуть, что выбор диссертантом объектов для включения в исследуемые в работе фармакологические пары обоснован глубоким и детальным анализом имеющихся в литературе сведений о компонентах изучаемой пары.

ДОСТОВЕРНОСТЬ И НОВИЗНА РЕЗУЛЬТАТОВ ДИССЕРТАЦИИ

Для селективной активации пролекарства в опухолевых клетках автором впервые были разработаны оригинальные системы, включающие фермент и пролекарство.

В качестве ферментного компонента фармакологической пары исследована мутантная форма рекомбинантной *Clostridium novyi* метионин–гамма-лиазы, содержащей гистидин (С115Н МГЛ).

Выбор фермента на основе метионин–гамма-лиазы (МГЛ) убедительно обоснован проведенным диссертантом анализом литературных данных, согласно которым истощение пула L-метионина в организме человека может быть эффективной стратегией для лечения некоторых типов рака. Показано, что МГЛ, будучи разрушающим метионин ферментом, ингибирует пролиферацию опухолевых клеток, обладает цитотоксическим и противоопухолевым действием.

Исследовавшаяся в работе мутантная форма метионин–гамма-лиазы С115Н МГЛ не катализирует типичную для нативной МГЛ реакцию γ -элиминирования L-метионина, но может превращать сульфоксиды S-алк(ен)ил-замещенного L-цистеина, выбранные в качестве пролекарств, в цитотоксические тиосульфиды.

В качестве средства, обеспечивающего направленную доставку к опухолевым клеткам пролекарства, был использован природный фитоэстроген дайдзеин.

Глубокий теоретический анализ имеющихся литературных данных по теме диссертационной работы позволил автору чётко сформулировать цель и задачи собственных исследований, привлечь адекватные современные методические приёмы для их реализации, что является несомненным достоинством диссертации.

Сформулированная диссертантом цель проведенного им исследования состояла в изучении механизма действия, цитотоксической и противоопухолевой активности фармакологических пар, включающих мутантную форму метионин-гамма лиазы (C115H МГЛ) и пролекарства на основе сульфоксидов цистеина, которые превращаются под действием фермента в цитотоксичные тиосульфиды.

В соответствии с поставленной целью работы диссертантом проведены экспериментальные исследования следующего содержания:

1. Получение в препаративных количествах *S. novyi* C115H метионин- γ -лиазы (C115H МГЛ) и её комплексов с дайдзеином (C115H МГЛ-Dz).
2. Определение параметров стационарной кинетики реакций β -элиминирования сульфоксидов S-алк(ен)ил-L-цистеина: S-метил-L-цистеина (метиин), S-этил-L-цистеина (этиин), S-пропил-L-цистеина (пропиин), S-аллил-L-цистеина (аллиин) и γ -элиминирования L-метионина, катализируемых C115H МГЛ и C115H МГЛ-Dz.
3. Изучение цитотоксической активности фармакологической пары [C115H МГЛ-Dz + сульфоксиды S-алк(-ен) ил-L-цистеина] на панели опухолевых клеток человека *in vitro*.
4. Оценка изменения маркёров апоптоза и изучение распределения опухолевых клеток по фазам клеточного цикла при ко-инкубации с фармакологической парой [C115H МГЛ-Dz + пропиин].
5. Изучение противоопухолевого эффекта фармакологической пары [C115H МГЛ-Dz + пропиин] на моделях ксенографтов опухолей человека с различной экспрессией мембранных рецепторов к эстрогенам у мышей Balb/c «nude» *in vivo*.

В результате проведенного экспериментального исследования автором впервые установлены новые научные факты, имеющие принципиальное значение для изучения фармакологических пар, включающих конъюгат мутантной формы метионин-гамма лиазы с дайдзеином и сульфоксиды цистеина [C115H МГЛ-Dz + сульфоксиды S-алк(-ен) ил-L-цистеина], а также для оценки перспектив использования фармакологических пар в терапии онкологических заболеваний, в целом.

Впервые показано, что модификация фермента метионин-гамма лиазы (C115H-МГЛ) дайдзеином не влияет на кинетические параметры конъюгированного фермента по сравнению с исходным, но значительно повышает его цитотоксичность в отношении опухолевых моделей с выраженной экспрессией мембранных рецепторов эстрогенов.

Впервые установлена цитотоксическая активность изученных фармакологических пар [C115H МГЛ-Dz + сульфоксиды S-алк(-ен) ил-L-цистеина] в отношении 12 культур клеток опухолей человека (рак предстательной железы линий PC3, 22Rv1 и DU145, рак молочной железы линий MCF7, SKBR3 и T47D, рак поджелудочной железы линий MIA-PaCa2 и Panc1, рак толстой кишки линий SW620, COLO 205, HT29 и HCT116).

Причём показано, что фармакологические пары, включающие пропиин [C115H МГЛ-Dz + пропиин], применённые в виде специально приготовленной смеси препаратов, оказались более цитотоксичными на разных культурах клеток *in vitro* по сравнению с парами C115H МГЛ-Dz, включающими метиин, этиин или аллин. Наиболее чувствительными к воздействию фармакологической пары с пропином оказались клетки культуры MCF7.

Впервые обнаружен противоопухолевый эффект *in vivo* фармакологической пары, содержащей конъюгат мутантной формы метионин-гамма лиазы с дайдзеином и сульфоксиды пропил цистеина [C115H МГЛ-Dz + сульфоксиды S-пропил-L-цистеина] на 6 моделях ксенографтов опухолей человека (рак предстательной железы 22Rv1, рак молочной железы SKBR3,

рак поджелудочной железы линий MIA-PaCa-2 и Panc1, рак толстой кишки линий SW620 и HT29).

Причём, наиболее значительный противоопухолевый эффект был выявлен на моделях с большей экспрессией мембранных рецепторов эстрогенов, таких как рак молочной железы SKBR3 (89% торможения роста опухоли) и рак предстательной железы 22Rv1(70% торможения роста опухоли).

Следует отметить, что препараты вводились мышам “nude” с уже сформировавшейся подкожно опухолью, объёмом 80-120 мм³, ежедневно на протяжении 10 суток с 1,5 часовым интервалом между введением фермента (МГЛ-Dz) внутрибрюшинно и пропиина интратуморально.

Показано на всех исследовавшихся моделях ксенографтов, что введение фармакологической пары [C115H МГЛ-Dz + пропиин] удовлетворительно переносилось животными, не вызвало значимого уменьшения массы тела и изменения в поведении мышей в течение всего периода наблюдения.

Впервые обнаружено, что механизм противоопухолевого действия дипропилтиосульфидатов связан с индукцией апоптоза в опухолевых клетках (рак предстательной железы 22Rv1) и остановкой клеточного цикла в фазе G₂/M (рак предстательной железы 22Rv1 и рак молочной железы SKBR3).

Следует специально подчеркнуть исключительно высокий методический уровень исследования и профессиональное владение диссертантом широким спектром современных методов биохимии и онкобиологии.

В работе использованы методы биохимии, молекулярной биологии, экспериментальной онкологии, дополненные статистическим и математическим анализом: выделение и очистка C115H МГЛ, определение концентрации, удельной активности, спектральных характеристик очищенных ферментов, электрофорез, получение и характеристика комплекса C115H МГЛ с дайдзеином, определение жизнеспособности культивируемых опухолевых клеток с помощью МТТ-теста *in vitro*, изучение противоопухолевой активности веществ на моделях ксенографтов опухолей человека,

перевиваемых на мышах “nude” *in vivo*, оценка экспрессии маркеров апоптоза в опухолевых клетках.

Диссертация Або Кура Луай содержит большой экспериментальный материал, глубокий анализ имеющихся в литературе и полученных в работе данных, выполнена на современном методическом уровне. Результаты исследования обладают несомненной достоверностью и новизной.

СТЕПЕНЬ ОБОСНОВАННОСТИ НАУЧНЫХ ПОЛОЖЕНИЙ, ВЫВОДОВ И РЕКОМЕНДАЦИЙ, СФОРМУЛИРОВАННЫХ В ДИССЕРТАЦИИ

Сформулированные в диссертации научные положения, выводы и рекомендации базируются на большом объёме экспериментальных исследований, выполненных с исключительной тщательностью и достоверностью лично автором, глубоком анализе литературных и собственных данных и являются полностью обоснованными и достоверными.

Диссертационная работа Або Кура Луай изложена на 118 страницах машинописного текста и состоит из введения, 6 глав, включающих обзор литературы, методическую часть, описание результатов собственных исследований и их обсуждение, а также выводов, списка сокращений и библиографического указателя, содержащего 188 источников. Диссертация иллюстрирована 13 рисунками, 4 схемами и 4 таблицами.

Основные положения диссертации сформулированы в виде 4 выводов. Выводы диссертации вытекают из результатов работы, соответствуют цели и задачам исследования, являются научно обоснованными и практически значимыми.

Необходимо подчеркнуть, что все научные положения, выводы и рекомендации, сформулированные в диссертации, базируются на экспериментальном материале, выполненном на современном методическом уровне с исключительной тщательностью, и являются обоснованными.

ЦЕННОСТЬ ДЛЯ НАУКИ И ПРАКТИКИ РЕЗУЛЬТАТОВ РАБОТЫ

Результаты диссертационной работы имеют несомненное научное и практическое значение, создают экспериментальную основу для развития

направления исследований, связанного с изучением возможностей и перспектив использования фармакологических пар в терапии онкологических заболеваний.

ПОДТВЕРЖДЕНИЕ ОПУБЛИКОВАНИЯ ОСНОВНЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ ДИССЕРТАЦИИ В НАУЧНОЙ ПЕЧАТИ

По теме диссертации опубликовано 7 научных печатных работ, среди которых 5 статей в журналах, индексируемых наукометрическими базами данных Scopus и Web of Science (Q1/Q2), а также рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ.

СООТВЕТСТВИЕ СОДЕРЖАНИЯ АВТОРЕФЕРАТА ОСНОВНЫМ ПОЛОЖЕНИЯМ ДИССЕРТАЦИИ

Содержание автореферата полностью соответствует содержанию и основным положениям диссертации.

ЗАМЕЧАНИЯ ПО РАБОТЕ

Принципиальные замечания по содержанию и оформлению диссертационной работы отсутствуют.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационное исследование Або Кура Луай «Механизм действия и противоопухолевая активность фармакологических пар *Clostridium novyi* C115H метионин–гамма-лиазы и сульфоксидов S-алкил-замещенного L-цистеина» является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится новое решение научной задачи по доклиническому изучению противоопухолевой эффективности и механизма действия фармакологических пар, содержащих пролекарство и активирующий его фермент, имеющей важное значение для разработки научных и практических основ применения фармакологических пар в терапии онкологических заболеваний.

Работа соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, согласно п.2.2 раздела II Положения о присуждении ученых степеней в федеральном

государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Российский университет дружбы народов им. Патриса Лумумбы», утвержденного Ученым советом РУДН протокол № 12 от 23.09.2019 г., а её автор, Або Кура Луай, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности «1.5.4. Биохимия», «3.1.6. Онкология, лучевая терапия».

Официальный оппонент:

Главный научный сотрудник
Федерального государственного
бюджетного учреждения науки РАН
Института биохимической физики
им. Н.М. Эмануэля РАН (ИБХФ РАН)
Доктор биологических наук («14.01.12. Онкология»)

Л.А.Островская

25.05.2023г.

Подпись главного научного сотрудника,
доктора биологических наук Л.А. Островской

заверяю

Учёный секретарь ИБХФ РАН
Кандидат биологических наук



С.И. Скалацкая

Москва, 119334, ул. Косыгина, дом 4
Телефон: 8 (903) 960-15-18
E-mail: Larros@list.ru