

## ОТЗЫВ

официального оппонента д.б.н., зав. лабораторией молекулярной генетики ФГАОУ ВО  
«Московский физико-технологий институт (государственный университет)» (МФТИ)

Манухова Ильи Владимировича

на диссертационную работу Або Кура Луая

«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

### Актуальность темы исследования

Химиотерапия является важнейшим звеном в системе лечения онкологических больных и применяется в 65% случаев лечения злокачественных новообразований. Её назначают не только как элемент комплексного и комбинированного лечения, дополняя традиционные хирургические и лучевые методы, но и самостоятельно при некоторых видах и локализациях опухолей. Однако большинство химиопрепаратов обладают рядом недостатков, к которым относится недостаточная эффективность, а также устойчивость опухолевых клеток к проводимой химиотерапии. Поэтому создание рациональных лекарственных форм, позволяющих наиболее полно реализовать возможности противоопухолевых препаратов, является актуальной задачей.

Существует ряд подходов к увеличению эффективности лекарственных препаратов, среди которых использование так называемых «фармакологических пар». Основная идея этого подхода заключается в следующем: на первом этапе в опухоль вводят специфический фермент, на втором этапе вводят нетоксичное пролекарство, которое служит субстратом этого фермента. При этом происходит превращение пролекарства в активный препарат, обладающий противоопухолевой активностью.

Метионин  $\gamma$ -лиаза (МГЛ) (КФ 4.4.1.11) – пиридоксаль-5'-фосфат-зависимый фермент, катализирующий реакции  $\gamma$ -элиминирования L-метионина и его аналогов и  $\beta$ -элиминирования S-замещенных аналогов L-цистеина. Антипролиферативное действие МГЛ связано с разрушением необходимого для злокачественного роста L-метионина. МГЛ и ее мутантная форма с заменой цистеина 115 на гистидин, выделенная из *Clostridium novyi*, может быть использована в ферментной пролекарственной терапии как компонент фармакологической пары с сульфоксидами S-алкил-замещенного L-цистеина, которые под ее действием превращаются в тиосульфиды, обладающие цитотоксической активностью.

Работа Або Кура Луая, посвященная изучению механизма действия и противоопухолевой активности фармакологических пар [C115H МГЛ-Dz + сульфоксиды S-алкил-замещенного L-цистеин] является целостной. В представленном материале прослеживается четкий, многоэтапный план исследований, позволивший провести разработку противоопухолевой терапии, начиная с получения фармакологической пары и ее характеристики, и заканчивая исследованием ее эффективности *in vitro* и *in vivo*.

Литературный обзор дает развернутое представление о концепции использования пролекарств в онкологии и основной идее использования фармакологической пары

«фермент-пролекарства». Особое внимание уделяется биохимической характеристике метионин  $\gamma$ -лиазы, и, в частности, ее мутантной формы C115H МГЛ. Приведен анализ исследований, посвященных оценке и ее эффективности при комбинированном использовании с другими противоопухолевыми агентами на моделях опухолевого роста *in vitro* и *in vivo*.

Работа выполнена с использованием широкого набора современных методов исследований, включающих методы выделения и очистки *S. novyi* C115H МГЛ, методы оценки ее ферментативной активности, методы определения цитотоксичности *in vitro* и противоопухолевой активности *in vivo*, а также методы статистического анализа полученных данных.

### **Достоверность и новизна полученных данных**

В результате проведенного экспериментального исследования соискателем впервые показано, что стационарная кинетика реакций  $\beta$ -элиминирования сульфоксидов S-алк(ен)ил-L-цистеина (метиин, пропиин и аллиин) и  $\gamma$ -элиминирования L-метионина, катализируемых *S. novyi* C115H МГЛ, практически не изменилась после модификации C115H МГЛ дайдзеином.

Впервые автор показал наличие цитотоксической активности фармакологических пар [C115H МГЛ-Dz + сульфоксиды S-алк(-ен)ил-L-цистеина] на двух культурах здоровых клеток (эмбриональная почка человека HEK-293, плацента человека) и 12 разных видах опухолевых клеточных линий, включая рак предстательной железы (линии PC3, 22Rv1 и DU145), рак молочной железы (линии MCF7, SKBR3 и T47D), рак поджелудочной железы (линии MIA-PaCa2 и Panc1), и рак толстой кишки (линии SW620, COLO 205, HT29 и HCT116) *in vitro*, и в результате показано, что [C115H МГЛ-Dz + пропиин] проявил наибольшую активность на всех клетках. SW620 и COLO 205 нечувствительны к терапии с [C115H МГЛ-Dz + пропиином] из-за отсутствия рецепторов, способных связывать дайдзеин. Также было показано, что все клетки нечувствительны к терапии с C115H МГЛ-Dz при отсутствии субстратов.

В диссертационной работе Або Кура Луая впервые показан противоопухолевый эффект фармакологических пар [C115H МГЛ-Dz + пропиин] на шести разных солидных типах ксенографтов опухолей человека, включая 22Rv1, SKBR3, MIA-PaCa2, Panc1 и SW620, *in vivo* у мышей balb/c nude. Наибольший противоопухолевый эффект был отмечен в группе комбинации [C115H МГЛ-Dz + пропиин] на раке молочной железы SKBR3 и торможение роста опухолей было достигнуто около 90%.

Таким образом, можно резюмировать, что в диссертации Або Кура Луай представлен инновационный подход к комбинированной терапии опухолей, и он оказался весьма успешным.

### **Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации**

Диссертационная работа Або Кура Луая изложена 118 листах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, главы «Материалы и методы», 3 глав с описанием результатов исследований, главы «Обсуждение результатов», выводов, списка

сокращений и списка литературы, включающего 188 источников. Диссертация иллюстрирована 13 рисунками, 4 схемами и 5 таблицами.

Основополагающие положения диссертации сформулированы в виде 4 выводов. Основные выводы диссертации следует из результатов исследования и соответствуют цели и задачи исследований.

#### **Ценность для науки и практики результатов работы**

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

1. Диссертация посвящена исследованию эффективности фармакологических пар, однако в положениях, выносимых на защиту нет ответа на основной вопрос: работают ли выбранные для исследования пары лучше, чем эти же препараты по отдельности.
2. В литобзоре на рис 2 приведена структура МГЛ, но не написано какая, из какого источника. В целом в работе не хватает структурных данных сравнения выбранной для работы МГЛ *C. novyi* с другими известными белками.
3. В обсуждении результатов подробно раскрыт апоптотический механизм воздействия на клетки аллицина, однако МГЛ так же может играть роль в апоптотических процессах. Этот аспект кажется недостаточно освещен в дискуссии.
4. Имеются опечатки и ошибки в тексте. Удивительно выглядит: «SDS-ПААГ», кажется, что надо или SDS-PAAG, или ДСН-ПААГ.

#### **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 активирующего его фермента, 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:

зав. лабораторией молекулярной генетики, главный научный сотрудник

ФГАОУ ВО «Московский физико-технологий институт

(государственный университет)» (МФТИ)

Манухов И.В.

141701, Московская область, г. Долгопрудный, Институтский переулок, д. 9.

Юридический адрес: 117303, г. Москва, ул. Керченская, д. 1 «А», корп. 1.

Телефон: +7(905)562-29-24; +7(495)408-45-54

E-mail: [manukhovi@mail.ru](mailto:manukhovi@mail.ru), [info@phystech.edu](mailto:info@phystech.edu), [info@mipt.ru](mailto:info@mipt.ru), сайт: [www.mipt.ru](http://www.mipt.ru)

Подпись д.б.н. Манухова И. В. заверяю,

Ученый секретарь МФТИ

Кандидат физико-математических наук, доцент



Е. Г. Евсеев