

ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени
кандидата биологических наук Максимчик Полины Валентиновны
на тему: «Стимуляция гибели опухолевых клеток воздействием на их
энергетику»
по специальностям 03.01.08 – «Биоинженерия», 03.01.04 – «Биохимия»

Актуальность избранной темы. Одним из главных направлений исследований современной биологической и медицинской науки является поиск причин возникновения злокачественных новообразований и эффективных способов борьбы с ними. Хорошо известно, что одним из важных физиологических изменений, приводящих к возникновению опухолей, является подавление апоптоза, наиболее изученной формы программируемой гибели клеток, ответственной за удаление из организма потенциально опасных или поврежденных клеток. Соответственно, стимуляция апоптоза с использованием различных методов молекулярной биологии и биоинженерии в раковых клетках является перспективной стратегией их элиминирования в организме. К примеру, подавление гликолиза в опухолевых клетках может выступать перспективной мишенью в направлении стимуляции гибели клеток опухоли. С другой стороны, учитывая ключевую роль митохондрий в инициации апоптоза, можно предположить, что специфическое воздействие на эти органеллы с помощью методов биоинженерии, а именно синтеза производных противоопухолевого средства бетулиновой кислоты путем ее конъюгирования с молекулой трифенилфосфония, которая способна вызвать пермеабиллизацию внешней мембраны митохондрий, а также применение наночастиц для доставки цитотоксического препарата в клетки повысит эффективность терапии. Помимо глюкозы, широкий спектр опухолевых клеток зависит от глутамина, используемого в качестве как субстрата энергетики, так и регулятора окислительно-восстановительного статуса клетки. Регуляция метаболизма

глутамин также может сенсibilизировать опухолевые клетки к действию широко применяемых терапевтических препаратов. Ответ на вопрос, в какой степени модуляция энергетики клетки будет способствовать элиминации клеток опухоли, является чрезвычайно важным для выработки эффективного направления противоопухолевой терапии, для поиска которого необходимо задействовать современные направления и возможности биоинженерии. Именно применение комплексного воздействия на опухолевые клетки, включающее наряду с традиционно применяемыми препаратами ингибиторы энергетики, стимуляторы окислительного стресса, ингибиторы белков-транспортеров, представляется оптимальным и перспективным. Поэтому Диссертационная работа Максимчик П. В., посвященная выявлению роли энергетики опухолевых клеток в устойчивости к терапевтическим средствам, и выработке стратегии элиминации раковых клеток воздействием на механизмы энергообеспечения представляется чрезвычайно важной и актуальной.

Структура работы. Диссертационная работа изложена на 128 страницах машинописного текста, содержит 20 рисунков и 1 таблицу. Работа состоит из следующих глав: введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов, обсуждения результатов, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Список литературы содержит 221 источник.

В главе «Обзор литературы» (38 стр.) автор подробно рассматривает особенности энергетики опухолевых клеток различной этиологии и вклад гликолиза и окислительного фосфорилирования в обеспечение энергией раковых клеток. Рассматривается роль глутамин и активных форм кислорода в опухолевых клетках. Обсуждаются различные пути индукции апоптоза. Существенное внимание также уделено роли митохондрий в гибели клеток и рассматривается их использование в качестве мишени для элиминации опухолевых клеток. Отдельный подраздел посвящен применению бетулиновой кислоты и ее аналогов в противоопухолевой терапии. Обзор написан подробно, с привлечением большого количества

источников литературы последних лет. Чувствуется, что автор хорошо знаком с проблематикой, которой посвящена работа.

В главе «Материалы и методы» представлены современные методы биохимии, биоинженерии и клеточной биологии, такие как культивирование различных злокачественных клеточных линий, трансфекция клеток, флуоресцентная микроскопия и проточная цитофлуориметрия, оценка токсического действия ряда химических агентов, вестерн-блот анализ, оценка апоптоза и некроза в различных злокачественных клеточных линиях. В принципе данный раздел написан подробно и позволяет воспроизвести приведенные автором методы. Используемые Максимчик П. В. методы позволяют решить задачи сформулированные в диссертационной работе.

В этом разделе встречаются некоторые неточности, требующие пояснений.

1. с. 51. Следовало указывать рН для всех приведенных буферных растворов, а не только для «избранных».
2. с. 55. В методическом разделе следовало указать видовую принадлежность линий клеток, использованных в экспериментах. Наверное это везде человек!?
3. р. 2.2.2. Следовало указать в каком соотношении происходил пересев (пассирование) клеток (1:1; 1:2; 1:3 или иначе!?).
4. «Для добавления индукторов апоптоза брали чашки с 70-80% конфлюентности». Неудачное выражение: отсутствует слово клетки!

В главе «Результаты исследований», которая состоит из нескольких подразделов, автор последовательно излагает результаты собственных экспериментов. Подробно описаны эксперименты по подавлению гликолитического пути с помощью 2-дезоксиглюкозы в различных культурах опухолевых клеток и его последствия для развития апоптоза в этих клетках. Далее автором представлены эффекты действия глутамина и его депривации в процессах ответа злокачественных клеток на некоторые используемые цитостатики. П. В. Максимчик получены данные свидетельствующие о том, что удаление глутамина из культуральной среды приводит к изменениям в

активности каспазы, одного из ключевых ферментов апоптоза. Ряд экспериментов посвящен роли активных форм кислорода в стимуляции апоптоза, индуцированного цисплатином и депривацией глутамина.

В следующем разделе представлены результаты действия бетулиновой кислоты (БК) и ее производных на раковые клетки разного происхождения. Приводятся данные свидетельствующие о повышенной эффективности действия производных БК при их конъюгировании с трифенилфосфонием, вследствие селективного переноса таких комплексов в митохондрии злокачественных клеток. Описаны результаты эффективного использования наночастиц для доставки терапевтических средств, таких как доксирубицин, к митохондриям раковых клеток. На основании собственных результатов автором отмечается важная роль Р-гликопротеина в стимулировании клеточной гибели клеток.

Представленные в данной главе результаты изложены профессионально, их достоверность не вызывает сомнений.

При ознакомлении с этим разделом возникает ряд вопросов, требующих пояснений.

1. рис. 3. Интересно узнать какой реальной концентрации (мМ) АТФ соответствует 100%.
2. Чем обусловлен выбор именно таких линий злокачественных клеток, использованных в настоящей работе, а не других. Например, распространенностью этих видов злокачественных новообразований у человека?
3. рис. 3А. Следовало указать на графике моменты введения ингибиторов функционирования митохондрий (олигомицин, FCCP и тд) по аналогии с рис. 12.

В главе «Обсуждение результатов» автор сопоставляет и обсуждает полученные результаты с известными к настоящему времени данными других исследователей. При этом автор приходит к выводу, что при выборе варианта противоопухолевой терапии следует учитывать особенности

метаболизма опухолевых клеток разной этиологии в каждом конкретном случае. Результаты работы демонстрируют, что удаление глутамина, либо подавление гликолиза в присутствии 2-дезоксиглюкозы изменяет клеточный ответ на терапевтические препараты, что представляет собой перспективное направление в противоопухолевой терапии. Однако, как установлено автором, это следует делать осторожно, поскольку при неверном выборе противоопухолевого препарата последствия могут быть далеки от желаемых. Результаты, полученные в ходе выполнения проекта, позволят приблизиться к выработке стратегии, основанной на комбинированной терапии с использованием как известных противоопухолевых цитотоксических агентов, так и соединений с непосредственным воздействием на энергетику опухолевых клеток.

В результате выполненной работы Максимчик П. В. удалось получить новые и приоритетные данные. Так автором впервые было показано, что обработка опухолевых клеток ряда линий ингибитором гликолиза 2-дезоксиглюкозой усиливает, апоптоз, индуцированный цисплатином, но подавляет его в клетках HCT116. Удаление другого важного метаболита глутамина из среды стимулирует цитотоксический эффект цисплатина в клетках нейробластомы TET21N, но подавляет апоптоз, индуцированный этопозидом. Обнаружено, что конъюгация производных БК с трифенилфосфонием позволяет существенно снизить действующую концентрацию препарата, тем самым устраняя нежелательные побочные эффекты. Обработка опухолевых клеток различной этиологии (колоректальный рак HCT116, RKO и нейробластома SH-SY5Y) наночастицами DOX-PSi NPs была эффективнее в сравнении с обработкой свободным DOX (доксирубицином).

Научная и практическая значимость работы Максимчик П. В.

В работе продемонстрировано, что удаление глутамина, либо подавление гликолиза с помощью 2-дезоксиглюкозы изменяет клеточный ответ на терапевтические антираковые препараты (в основном усиливая их действие),

что представляет собой перспективное направление противоопухолевой терапии. Результаты, полученные в ходе выполнения диссертационной работы, безусловно позволят приблизиться к выработке стратегии, основанной на комбинированной терапии рака с использованием известных противоопухолевых цитотоксических агентов и соединений с непосредственным действием на энергетику опухолевых клеток.

Достоверность результатов работы не вызывает сомнений, поскольку они базируются на достаточном объеме экспериментального материала. Достоверность результатов подтверждается также их воспроизводимостью и использованием современных методов исследования и статистической обработки: на всех этапах применялись современные способы получения репрезентативных данных.

Выводы диссертации обоснованы и логично вытекают из полученных результатов и их обсуждения.

Принципиальных замечаний по диссертационной работе не имеется. Указанные выше незначительные замечания не умаляют значимости очень интересного диссертационного исследования.

Автореферат полностью соответствует содержанию диссертации.

По материалам диссертационного исследования опубликовано 10 печатных работы (4 статьи в рецензируемых журналах и 6 тезисов докладов). Материалы диссертации были доложены на ряде Российских и международных конференций.

Заключение. Диссертационная работа Максимчик Полины Валентиновны «Стимуляция гибели опухолевых клеток воздействием на их энергетику» отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспортам специальностей 03.01.08 – «Биоинженерия» и 03.01.04 – «Биохимия» (по биологическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном

университете имени М.В. Ломоносова, а также оформлена, согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Таким образом, соискатель Максимчик Полина Валентиновна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям: 03.01.08 – «Биоинженерия» и 03.01.04 – «Биохимия».

Официальный оппонент:

профессор, доктор биологических наук, заведующий Лабораторией молекулярной генетики соматических клеток Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт молекулярной генетики РАН



Гривенников Игорь Анатольевич

5.12.2018

Адрес места работы и контактная информация:

123182 Москва, площадь академика И.В. Курчатова, д. 2. Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной генетики РАН;

тел. 8 (499) 196-00-14; эл. почта: igorag@img.ras.ru

Кандидатская диссертация: специальность - 03.01.04 – Биохимия

Докторская диссертация - 14.00.25 - Фармакология, клиническая фармакология; 03.00.03 - Молекулярная биология

Подпись Гривенникова Игоря Анатольевича удостоверяю:

Ученый секретарь Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт молекулярной генетики РАН, канд. биол. наук



Андреева Людмила Евгеньевна

Дата 5 декабря 2018 г.