

«УТВЕРЖДАЮ»

Проректор по научной работе
Федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего
профессионального образования «Санкт-
Петербургский государственный
университет»

проф. Н.Г. Скворцов

14 декабря 2011 г.

ОТЗЫВ

Ведущего учреждения на диссертацию Скворцова А.Н. «Механизм поступления цисплатина в клетки с участием системы транспорта меди», представленной на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальностям «биохимия» - 03.01.04 и «биофизика» - 03.01.02.

К настоящему времени накоплено достаточное количество фактов, свидетельствующих о том, что существует связь между метаболизмом меди, опухолевым ростом и молекулярным механизмом действия противоопухолевых препаратов на основе платины (цисплатин и его аналоги, широко используемые в клинической практике). Около 10 лет назад было обнаружено, что дрожжи, дефектные по высоко консервативному в эволюции трансмембранному белку CTR1 приобретают устойчивость к содержащим платину препаратам. В настоящее время участие транспортирующих медь белков в переносе платиновых препаратов стало частью общепринятой концепции молекулярного механизма действия цисплатина.

Очевидно, что использование корреляций между метаболизмом меди, опухолевым ростом и транспортом цисплатина является многообещающим подходом для создания более эффективных протоколов противоопухолевой терапии. Однако понимание природы этой взаимосвязи на данный момент является еще недостаточным для ее рационального использования. Поэтому диссертационная работа Скворцова Алексея Николаевича, в которой исследован транспорт платины и опухолевый рост на моделях млекопитающих с измененным метаболизмом меди, а также проанализированы

структурные основы связывания платиновых препаратов с белком-переносчиком меди CTR1, несомненно, является *актуальной*.

Конкретно, в рецензируемой работе содержатся:

- построение модели функционального гомотримерного комплекса белка CTR1 на базе данных филогенетического анализа последовательностей генов разных видов и молекулярного моделирования, на основе которой выдвинута гипотеза о возможности согласованного транспорта меди и платины;
- исследование экспрессии гена *CTR1* в органах грызунов и соотнесение уровня экспрессии с накоплением известных субстратов CTR1 – меди, серебра и платины;
- исследование кинетики и молекулярных механизмов связывания комплексов платины с белками в модельных системах *in vitro*;
- подробная характеристика модели лабораторных грызунов со сниженным уровнем меди в сыворотке крови, индуцированным добавлением в корм ионов серебра;
- изучение распределения цисплатина и роста опухолей у животных с измененным уровнем меди в сыворотке крови.

Экспериментальные подходы, использованные автором, включают применение целого арсенала методов как биохимии и молекулярной биологии, так и подходов молекулярной биофизики. По этой причине диссертация представлена к защите по двум специальностям – биохимии и биофизики, что представляется обоснованным.

Одним из основных положений, разрабатываемых в диссертации, является гипотеза, согласно которой медь необходима для продуктивного транспорта цисплатина через CTR1, таким образом, транспорт меди и цисплатина не являются чисто конкурентными процессами. Исходной посылкой для создания этой гипотезы явилось противоречие между необратимым связыванием цисплатина с остатками метионина в CTR1, приводящим к инаktivации препарата (четко продемонстрированным в работе в экспериментах *in vitro*), и наличием транспорта *in vivo*. В качестве фактора, препятствующего необратимому связыванию *in vivo* и позволяющего преодолеть указанное противоречие, автор предлагает рассматривать динамический поток меди через транспортирующий медь канал. При этом автор полагает, что при определенных условиях скорость поступления цисплатина в клетки должна коррелировать с транспортом меди. Это предположение хорошо согласуется с результатами, полученными автором при исследовании модели лабораторных животных.

В качестве модельного объекта с измененным метаболизмом меди были выбраны мыши и крысы, получающие с кормом хлорид серебра. Подробная характеристика этой

модели, исследование распределения серебра и динамики метаболизма меди, демонстрация природы дефицита меди в сыворотке крови, являются значительным достижением рецензируемой работы.

Исследование распределения платины в организме животных, получающих хлорид серебра, находится в соответствии с предположением о совместном транспорте меди и платины: дефицит меди в сыворотке крови таких животных приводит к замедлению поступления платины в органы из сыворотки крови по сравнению с контролем. Другим важным положением диссертации является выявление влияния экспериментального дефицита меди у мышей на рост ксенотрансплантатов опухоли человека и подтверждение наличия феноменологической связи между опухолевым ростом и метаболизмом меди в различных животных моделях.

Диссертация состоит из введения, шести глав и заключения, в конце работы приведены описание использованных методик и список цитированной литературы. Обзор состояния проблемы и положение конкретных результатов диссертации в контексте современных данных литературы приведены в каждой главе.

В первой главе на основании анализа консервативных участков последовательностей белка *CTR1*, профиля гидропатии, предположительной вторичной структуры, построения молекулярных моделей и анализа координационных свойств аминокислотных остатков построена и обсуждена модель функционального медьтранспортного трансмембранного комплекса, образуемого продуктом гена *CTR1*. Соискатель развивает предположение, согласно которой функции *CTR1* не ограничиваются переносом меди через мембрану, но и включают в себя передачу меди внутриклеточным медным шаперонам и принятию меди от внеклеточных доноров (церулоплазмин, гистидиновый комплекс меди), которое аргументируется оценками энергий связывания и результатами молекулярного докинга. На основании теоретического анализа автор делает вывод, что селекция ионов осуществляется по сочетанию их положительного заряда и высокой поляризуемости (которые характерны для восстановленной меди, серебра и активированных молекул цисплатина), и предлагает молекулярную модель транспорта ионов меди и противоопухолевых комплексов платины при их транспорте через белок *CTR1*.

Вторая часть работы направлена на подтверждения роли *CTR1* в транспорте меди *in vivo* в организме млекопитающих. С помощью полуколичественного ОТ-ПЦР анализа определена экспрессия гена *CTR1* в органах крыс, различающихся типом метаболизма меди – печени, сердце, отделах мозга и лактирующей молочной железе, а также в органах взрослых мышей. На данном этапе работы соискателем убедительно

показано, что экспрессия гена *CTR1* положительно коррелирует с потребностью клеток в меди, которая складывается из расхода меди на формирование внутриклеточных медьсодержащих ферментов при росте клеточной массы и из расхода меди на синтез секретируемого церулоплазмينا. В соответствии с этой закономерностью, молочная железа при лактации и печень при переключении типа метаболизма меди с взрослого на эмбриональный, обладают сложным характером изменений внутриклеточного содержания меди, экспрессии генов *CTR1* и церулоплазмينا во времени. Корреляция между концентрацией меди в органах мышей и экспрессией гена *CTR1* в тех же органах положительна, но менее выражена. Результаты убедительно свидетельствуют о том, что *CTR1* может рассматриваться как важнейшее звено, связывающее метаболизм меди в клетке и ее гомеостаз на уровне организма.

В третьей части работы на основании исследования ряда модельных *in vitro* систем подтверждены предположения о роли медьсвязывающих мотивов *CTR1* в транспорте платины. Проведены исследования свойств ряда координационных соединений платины и анализ кинетики реакций цисплатина с различными биомолекулами – аминокислотами, белками, ДНК. Для исследований использованы новые и весьма перспективные методы многомерной статистики, этот подход используется для изучения данных систем впервые. Показано, что цисплатин в первую очередь реагирует с белками по остаткам метионина и на скорость этой реакции оказывает значительное воздействие электростатическая составляющая. На основании количественного анализа кинетики реакций построена динамическая модель, которая позволила оценить время жизни промежуточных продуктов реакции цисплатина с тиоэфирными группами метионина. Установлено, что монодентантные комплексы являются короткоживущими, после чего быстро происходит необратимое связывание, и потеря исходных лигандов цисплатина, при этом цисплатин теряет свои ДНК-связывающие свойства. Таким образом автором подтверждены предпосылки для создания гипотезы согласованного транспорта, изложенные в первой части работы.

Четвертая глава содержит характеристику модели «Ag-грызунов», получающих с кормом $AgCl$. Показано, что у этих животных устанавливается состояние, характеризующееся низкой концентрацией меди в сыворотке крови при отсутствии токсических эффектов; в сыворотке крови холо-церулоплазмин замещен на неактивные серебросодержащие полипептиды церулоплазмينا, которые достаточно подробно охарактеризованы в работе. Эффекты у мышей и крыс сходны. «Ag-грызуны» достаточно интересны как модель животных с селективным дефицитом церулоплазминовой меди: изменения метаболизма меди в клетках печени и

распределения меди в органах незначительны. В диссертации также содержится исследование распределения серебра в организме мышей: оно обратимо накапливается в печени и надпочечниках, в клетках печени оно локализуется в митохондриях. Правдоподобным выглядит предположение автора, что серебро переносится по метаболическим путям восстановленной меди, и что это свойство может быть использовано для изучения известных и выявления новых путей транспорта меди в организме.

В двух заключительных главах работы представлены результаты влияния измененного статуса меди у грызунов соответственно на динамику накопления и выведения платины после инъекции цисплатина и на рост перевитых опухолей. Выявлено, что изменения метаболизма меди, индуцированные AgCl, как у мышей, так и у крыс, приводят к изменению накопления платины в органах, которые можно охарактеризовать как задержку поступления цисплатина из сыворотки крови в органы. Напротив, введение солей меди мышам непосредственно перед инъекцией цисплатина, увеличивает количество платины, детектируемой в организме через продолжительные сроки. Также продемонстрировано влияние ионов серебра на степень чувствительности к цисплатину культивируемых клеток, различное для двух клеточных линий, отличающихся профилем экспрессии потенциальных транспортеров цисплатина. Результаты в общем находятся в лучшем соответствии с предложенной гипотезой о согласованном транспорте меди и цисплатина через CTR1, чем с теорией конкуренции меди и цисплатина за CTR1.

В заключительной части работы представлены мета-анализ литературы и исследования трех различных моделей опухолевого роста у мышей, которые демонстрируют, что опухолевый рост внепеченочной локализации сопровождается увеличением показателей статуса меди и (в мышинных моделях) интенсификацией метаболизма меди в печени. Автор предполагает, что одной из причин увеличения показателей статуса меди является повышенная потребность опухоли в меди для синтеза медьсодержащих ферментов новых поколений клеток и для неоваскуляризации. В соответствии с этим предположением снижение показателей статуса меди должно быть неблагоприятно для опухоли. В диссертации был исследован рост ксенотрансплантатов опухоли человека у иммунодефицитных мышей с дефицитом церулоплазминовой меди, индуцированным AgCl. В определенных условиях AgCl-диета вызывала подавление роста ксенотрансплантата, сопровождавшееся четкими признаками апоптоза в опухоли. При этом по результатам представленным в

диссертации представляется маловероятным, что подавление происходит из-за острого дефицита меди или из-за действия серебра (которое в опухоли накапливается слабо).

В диссертационной работе использован достаточно широкий набор методик биофизики и биохимии (спектроскопия поглощения и кругового дихроизма в УФ диапазоне, ядерного магнитного резонанса; рентгеноструктурный анализ, кинетические исследования с использованием многомерной регрессии, измерение атомной концентрации металлов, измерение ферментативной активности в геле и кинетическими методами, полуколичественный ОТ-ПЦР анализ, иммуноблоттинг, эксперименты на клеточных культурах и др.). Использованные в диссертации экспериментальные методы биохимии и биофизики, а также расчетные подходы и статистические методы кратко, но емко описаны в соответствующем разделе работы. Все описанные методы использованы адекватно. Экспериментальные данные статистически достоверны. Опыты на животных осуществлены с использованием представительных групп. Результаты подвергнуты корректной статистической обработке. Большинство ключевых положений диссертации проверено с помощью нескольких независимых подходов. Теоретический анализ последовательностей и молекулярных структур и мета-анализ литературы выполнены с помощью хорошо зарекомендовавших себя алгоритмов с привлечением современных баз данных. В соответствии с указанными обстоятельствами, *достоверность полученных результатов* не вызывает сомнений. Представленные в работе данные обсуждены детально и всесторонне, с привлечением данных литературы. Интерпретация результатов и сделанные на их основе выводы корректны и убедительны.

Список цитированной литературы представительный, включает в себя преимущественно работы за последние 10 лет. Он содержит ссылки на ключевые работы по исследованию строения и функции белка CTR1, биохимии и транспорта платиновых препаратов, влиянию серебра на метаболизм меди. Сравнение результатов диссертации с контекстом литературных данных по заявленной проблематике свидетельствует, что они соответствуют современному мировому уровню. Автореферат полно отражает содержание диссертации. По результатам диссертации опубликовано 15 статей, из них – 13 в журналах, входящих в список ВАК. Результаты работы были представлены на профильных конференциях различного уровня, включая 9 международных. Все основные результаты и выводы полностью отражены в указанных публикациях и тезисах докладов.

Все представленные соискателем результаты являются *новыми* (или являлись таковыми на момент их получения). К ним относятся теоретическая структурно-

функциональная модель транспортера CTR1, построенная на основе молекулярного моделирования и филогенетического анализа (модели, построенные на экспериментальных данных появились в литературе позже и хорошо соответствуют модели, предложенной соискателем); данные по сопоставлению экспрессии CTR1 в органах с накоплением меди, серебра и платины у грызунов в тех же органах; количественная кинетическая модель взаимодействия цисплатина с остатками метионина, основанная на анализе кинетики реакций; структуры и характеристики ряда комплексов платины, использованных в качестве модельных объектов; демонстрация влияния ионов серебра на токсичность цисплатина по отношению к клеточным линиям; подробная характеристика модели лабораторных животных с дефицитом церулоплазмин-ассоциированной меди; обнаружение изменений фармакокинетики цисплатина у таких животных; обнаружение влияния дефицита церулоплазмин-ассоциированной меди на рост ксенотрансплантатных опухолей.

Научно-практическое значение диссертации, во-первых, несомненно, определяется связью ее проблематики с химиотерапией злокачественных опухолей. Работа выявляет и подчеркивает взаимосвязь между опухолевым ростом, показателями статуса меди, влиянием ионов серебра на млекопитающих и чувствительностью организмов и клеток к противоопухолевым препаратам типа цисплатина. Следует отметить, что цисплатин по-прежнему является одним из наиболее эффективных противоопухолевых препаратов и расширение спектра его действия и преодоление побочных эффектов остаются задачами высокой степени важности.

Поскольку связь транспорта цисплатина с метаболизмом меди становится общепринятой концепцией, в литературе появляются предложения использовать медь для влияния на его фармакологические свойства. Рецензируемая диссертация демонстрирует возможность влиять как на фармакокинетику цисплатина, так и непосредственно на опухолевый рост путем изменения статуса меди. Это представляет очевидный практический интерес: в перспективе развитие положений, предложенных в диссертации, может способствовать разработке более эффективных препаратов и протоколов применения цисплатина.

В то же время, работа впервые выявляет сложный характер связи между импортом меди и платины в органы, несводимый к простой конкуренции между ними. Обнаруженные автором эффекты (усугубление нефротоксических эффектов цисплатина у грызунов с измененным статусом меди, отсутствие ингибирующего действия AgCl-диеты на опухолевый рост при незначительном изменении ее

формулировки) показывают, что нерациональное воздействие на метаболизм меди может привести к неблагоприятным результатам. Таким образом, работа привлекает внимание к важности дальнейших исследований связи транспорта меди, серебра и платины в организме млекопитающих и к необходимости исследования и учета показателей статуса меди при проведении химиотерапии платиновыми цитостатиками

. Во-вторых, диссертация расширяет представления о метаболизме меди, который сам по себе является чрезвычайно важным процессом, и нарушения которого сопряжены с развитием различных серьезных патологий. В связи с этим охарактеризованная в работе модель животных с измененным статусом меди, выгодно отличающаяся по ряду показателей от других моделей, может служить отправной точкой для исследования метаболизма меди и медьдефицитных состояний.

В-третьих, работа имеет определенное значение в контексте влияния серебра на млекопитающих. Серебро используется в качестве антисептика с давних времен, негласно считается безопасным для человека и широко используется в практике, но при этом механизмы его воздействия на млекопитающих изучены чрезвычайно слабо. Представленные в рецензируемой диссертации результаты расширяют понимание метаболизма серебра, показывают, что серебро специфически транспортируется, в организме млекопитающих, обратимо накапливаясь в некоторых органах. Результаты работы дают основание для развития в перспективе новых рациональных способов применения серебра, основанных на знании его транспорта в организме и в клетке.

В работе нами не выявлено существенных недостатков. При рассмотрении работы и автореферата возникли перечисленные ниже вопросы и замечания:

1. В диссертации приведены два протокола сочетания AgCl-диеты с перевивкой опухоли, которые привели к формально противоположным результатам. В то же время подробная биохимическая характеристика проведена только для одного из протоколов, который привел к гибели ксенторансплантата, и только он приведен в автореферате. Чем вызвана такая избирательная характеристика?

2. Из построения теоретической модели CTR1 автор делает вывод, что серебро может транспортироваться через CTR1 более эффективно, чем медь. Наблюдался ли такой эффект в экспериментах и как это согласуется с тем, что серебро селективно накапливается только в определенных органах?

3. В автореферате указано, что результаты работы представлялись на многочисленных конференциях, многие из которых – достаточно высокого уровня. В то же время, нигде не приведены ссылки на публикации тезисов этих конференций.

4. Часть работ по теме диссертации (5 из 15) опубликована в журналах преимущественно химического направления. Какая часть результатов диссертации соответствует этим работам и как они соотносятся с общей проблематикой диссертации?

5. В диссертации описано достаточно большое количество комплексов платины, однако, все биохимические исследования проводились только с цисплатином. Исследовалась ли биологическая активность других комплексов платины? Чем был обусловлен выбор цисплатина среди других разрешенных для клинического использования противоопухолевых препаратов на основе платины? Участвует ли CTR1 только в транспорте цисплатина или способен переносить и другие препараты?

Данные вопросы и замечания не влияют на общую положительную оценку рецензируемой диссертации. Результаты и методические разработки, представленные в диссертации Скворцова А.Н., могут быть использованы в научно-исследовательской работе следующих учреждений: Института экспериментальной медицины СЗО РАМН, Медицинской Академии им. И. П. Павлова, Медицинской Академии постдипломного образования, Санкт-Петербургского государственного политехнического университета, а также в лекциях по, биохимии (биохимия микроэлементов), биофизики и молекулярной биологии, а также по экспериментальным методам исследования для студентов соответствующих специальностей Санкт-Петербургского государственного университета и Санкт-Петербургского государственного политехнического университета.

Заключение. Диссертация Скворцова Алексея Николаевича «Механизм поступления цисплатина в клетки с участием системы транспорта меди» содержит разработку положений, совокупность которых может быть квалифицирована как научное достижение. В диссертации решены актуальные задачи, и по своей новизне, теоретической и практической ценности, объему выполненных исследований, достоверности полученных результатов полностью соответствует требованиям ВАК России, предъявляемым к диссертациям, представленным на соискание ученой степени доктора наук. Соискатель, Скворцов Алексей Николаевич, заслуживает присуждения

искомой степени - доктора биологических наук по специальностям 03.01.04- биохимия и 03.01.02 –биофизика.

Отзыв составлен профессором кафедры биохимии Биолого-почвенного факультета ФГБОУ ВПО «СПбГУ» д. б.н. Кулевой Н.В

Отзыв на диссертацию Скворцова А.Н. был рассмотрен на совместном заседании кафедры биохимии кафедры биофизики Биолого-почвенного факультета ФГБОУ ВПО СПбГУ 7 декабря 2011, протокол № 14.

Заведующий кафедрой биохимии
Заведующий кафедрой биофизики



Стефанов В.Е.
Крутецкая З.И.