

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора биологических наук, профессора РАН, заведующего лабораторией регуляции экспрессии генов Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт цитологии Российской академии наук» Барлева Николая Анатольевича на диссертационную работу Кирсанова Кирилла Игоревича «Узкобороздочные лиганды в канцерогенезе и противоопухолевой терапии», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 14.01.12 – онкология

Актуальность темы

Несмотря на значительный прогресс в лечении онкологических заболеваний, достигнутый благодаря совершенствованию диагностики, хирургических и лекарственных методов терапии, смертность онкологических больных не снижается. Одной из причин этого является недостаточный арсенал лекарственных средств в онкологии. Генотоксические препараты первого поколения действуют на все активно размножающиеся клетки организма, что приводит к гибели как опухолевых, так и нормальных клеток, в результате чего могут развиваться тяжелые побочные эффекты. Также генотоксические препараты могут стать причиной развития генетической нестабильности в клетках опухоли, что способствует более агрессивному течению заболевания. Более того, как показано, ряд таких препаратов способен индуцировать появления новых очагов первичных опухолей.

Действие таргетных препаратов направлено на модулирование активности определенных белков, функциональная активность которых связана с регуляцией ключевых клеточных функций (пролиферация, апоптоз и т.д.) Такие препараты, к сожалению, оказываются эффективны лишь для небольшой доли онкологических пациентов. Кроме того, для некоторых из таких агентов установлен тканеспецифический профиль токсичности (не связанный с непосредственной локализацией опухоли), что в свою очередь также определяет наличие тяжелых побочных эффектов.

Одним из наиболее эффективных подходов к лечению большинства онкологических заболеваний в настоящее время признана комбинированная химиотерапия, при которой помимо основного цитотоксического агента пациент получает другие препараты, позволяющие скорректировать направленность действие основного препарата, увеличить его терапевтический интервал, а также избирательно увеличить чувствительность опухолевых клеток к нему. Одним из перспективных направлений исследований в области совершенствования комбинированной химиотерапии является использование малых ДНК-тропных молекул, не связывающихся с ДНК ковалентно. Позиционируясь вдоль структуры

макромолекулы или интеркалируя в неё, такие агенты способны в значительной степени менять стерические характеристики ДНК и изменять структуру хроматина. Это приводит к модулированию работы ферментов метаболизма ДНК (полимеразы, хеликазы, белки репарации), что определяет широкий спектр биологических активностей этих соединений. Для некоторых представителей узкоборозочных лигандов была показана способность ингибировать активность протеинкиназ (как серин-треониновых киназ, так и тирозиновых киназ), топоизомераз I и II. Для других – продемонстрирована способность замедлять рост химически индуцированных и спонтанных опухолей (антиканцерогенное действие биофлавоноидов). Работа Кирсанова К.И. представляет собой первое комплексное исследование биологических эффектов и механизмов действия узкоборозочных лигандов, что является актуальным направлением как для разработки стратегии профилактики онкологических заболеваний, так и для совершенствования протоколов химиотерапевтического лечения.

Содержание и завершенность работы

Диссертационная работа Кирсанова К.И. выполнена на высоком профессиональном уровне, достоверность полученных результатов не вызывает сомнений.

Работа построена по классической схеме и состоит из введения, семи глав, заключения, выводов, списка литературы, включающего 275 источников, а также восьми приложений. Диссертация изложена на 266 страницах машинописного текста, иллюстрирована 40 таблицами и 81 рисунком.

Во «Введении» автором обосновывается актуальность и степень разработанности проблемы, формулируется цель и задачи исследования, представляется научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы.

Каждая из последующих шести глав посвящена определенному аспекту действия малых ДНК-тропных молекул и содержит краткий обзор литературы по данной теме, результаты собственных исследований, их анализ и обсуждение.

Глава 1 посвящена механизмам взаимодействия малых ДНК-тропных молекул с ДНК и их влиянию на структуру хроматина. В начале главы приводятся литературные данные по механизмам действия агентов, осуществляющих нековалентное связывание ДНК, их молекулярно-биологическим свойствам, а также их применению в противоопухолевой терапии. В подразделе «Результаты собственных исследований» автор приводит результаты экспериментов по изучению сиквенс-специфичности малых ДНК-тропных молекул, способности этих веществ топоизомеразу и их влиянию на хроматин. Автору впервые удалось доказать способность изученных молекул вызывать дестабилизацию хроматина. Было

продемонстрировано, что узкобородочные лиганды (УБЛ) вызывают исключение линкерного гистона из хроматина и привлечение белка-шаперона FАСТ в хроматин.

Глава 2, «Влияние узкобороздочных лигандов на функционирование поли(АДФ-рибоза)-полимеразы I» посвящена исследованию способности малых ДНК-тропных молекул ингибировать активность фермента PARP 1. Было показано, что как *in vitro* так и *in vivo*, практически все изученные молекулы способны подавлять специфически только ДНК-зависимую активацию PARP1. Показано, что вытеснение PARP1 из зон конденсированного гетерохроматина, вызванное действием ДНК-тропных молекул, приводит к реактивации экспрессии ретротраспозонов и накоплению их мРНК в цитоплазме, что открывает новые перспективы исследования мобильных элементов генома в норме и при патологии.

Глава 3 посвящена изучению эпигенетической активности УБЛ и содержит результаты исследования влияния этих молекул на метилирование ДНК и модификации гистонов. Свойства УБЛ были изучены на поликлональной клеточной популяции HeLa T1, системе для скрининга эпигенетически-активных соединений, разработанной автором и его коллабораторами. Отдельный подраздел этой главы посвящен результатам тестирования эпигенетически активных соединений, а также изучению активности системы метаболической активации в популяции HeLa T1. Было продемонстрировано, что HeLa T1 может быть использована для скрининга эпигенетической активности ксенобиотиков, требующих метаболической активации.

В главе 4, «Мутагенные, рекомбиногенные и бластомогенные свойства узкобороздочных лигандов», описаны методы выявления различных типов нарушения ДНК и стратегия исследования ксенобиотиков в краткосрочных тестах. В подразделе с результатами собственных исследований приведены данные по тестированию мутагенной активности ДНК-тропных молекул в тесте Эймса, цитогенетической активности в тесте на хромосомные aberrации, бластомогенной и рекомбиногенной активностей в тесте на *Drosophila melanogaster*. По результатам этой серии экспериментов впервые удалось продемонстрировать, что некоторые ДНК-тропные молекулы обладают рекомбиногенным эффектом.

Автором диссертационной работы было изучено действие малой ДНК-тропной молекулы кураксин СВL0137 на процесс канцерогенеза в экспериментах *in vivo* (глава 5). Впервые было продемонстрировано, что это соединение обладает значительным противоопухолевым действием. Было показано, что в основе такого эффекта лежат не только противовоспалительные и проапоптотические свойства кураксина, но и его ингибирующее действие на активность сигнального пути WNT.

Глава 6 посвящена изучению противоопухолевой активности УБЛ. В работе впервые показана способность диминазена увеличивать чувствительность опухолевых клеток к действию некоторых генотоксических и таргетных препаратов *in vitro* и *in vivo*. Была выявлена

противоопухолевая активность кураксина в отношении опухолей толстой кишки и сарком матки, а диминазена - в отношении сарком матки и лимфом.

Глава 7 содержит описание материалов и методов, использованных в экспериментальной работе. В качестве методологической основы исследования были использованы комплексный и системный подходы.

В разделе «Заключение» автором обобщены основные результаты проведенного исследования.

Выводы диссертации отражают полученные результаты выполненного исследования и адекватны поставленным задачам. Автореферат по содержанию полностью соответствует тексту диссертации.

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

Диссертационная работа выполнена на высоком теоретическом и методическом уровне с применением современных молекулярно-биологических методов. Текст диссертации написан легким для понимания биологами и медиками различных специализаций языком, результаты работы представлены в логичной форме. Объем исследований достаточен для обоснования и формулирования представленных выводов.

Достоверность и новизна научных положений, выводов и рекомендаций

Достоверность результатов работы базируется на корректном использовании современных молекулярно-биологических методов лабораторных исследований. Достоверность результатов исследования опирается на грамотную статистическую обработку и подтверждается их сопоставлением с данными литературы. Методическая база соответствует поставленным цели и задачам исследования. Объем проведенной экспериментальной работы достаточен для получения достоверных данных.

В представленной диссертационной работе автором впервые проведен комплексный анализ молекулярных механизмов действия узкобороздочных лигандов, возможности их использования для профилактики онкологических заболеваний, а также для терапии злокачественных новообразований в монорежиме и в комбинации. В целом, данные, полученные автором, являются новыми научными знаниями в онкологии.

Результаты исследования изложены в 79 научных работах, из которых 29 статьи опубликованы в журналах, рекомендованных перечнем ВАК при Минобрнауки России. Основные положения диссертации были доложены на научных конференциях в России и за рубежом.

Замечания:

Несмотря на высокий уровень представляемой работы, имеются некоторые замечания. В частности, хотелось бы отметить наличие орфографических ошибок, а также не всегда уместное использование англицизмов. Также имеются замечания в плане оформления рисунков. Так, например, в Рис. 20 не понятно, что представляют верхние и нижние ряды фотографий.

Автор пишет, что «в ходе исследования сиквенс-специфичности кураксина было показано, что данный агент обладает сродством к последовательностям AGCCG, CAACA, TGTTT, TCATG, GGCATG». К сожалению, в ходе выполнения этой работы не удалось обнаружить ДНК-связывающие белки, которые предпочтительно используют эти последовательности. В качестве пожелания на будущее хотелось бы посоветовать использовать биоинформатический анализ на предмет возможных топологических структур образующихся этими последовательностями, которые узнаются соответствующими белками-хроматиновыми шаперонами.

В описании результатов представленных на Рис. 50 не совсем правомерно говорить о синергическом действии ингибиторов эпигенетических факторов и УБЛ, поскольку такое утверждение нужно было доказывать с использованием формулы Чоу-Талалэй (Chou-Talalay), которая требует применения рядов концентраций исследуемых веществ.

В обзоре главы 5 стоило, вероятно, упомянуть о роли острого и хронического воспаления для канцерогенеза – только хроническая форма воспаления способствует онкогенезу.

Хочется еще раз отметить, что вышеуказанные замечания ни коим образом не снижают высокого научного уровня представленной диссертационной работы и не ставят под сомнения достоверность полученных результатов, а лишь указывают на те моменты, на которые стоит обратить внимание в дальнейшей работе.

Заключение

Таким образом, диссертационная работа Кирсанова Кирилла Игоревича «Узкобороздочные лиганды в канцерогенезе и противоопухолевой терапии» является законченной, самостоятельной научно-квалификационной работой, которая вносит значительный вклад в развитие фундаментальной онкологии: проведен комплексный анализ и выявлен спектр ДНК-опосредованных биологических эффектов малых ДНК-тропных молекул, что позволяет рассматривать эти соединения в качестве перспективных модуляторов действия

канцерогенов с целью профилактики канцерогенеза и модуляторов действия противоопухолевых препаратов с целью совершенствования противоопухолевой терапии. Диссертация соответствует всем требованиям «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24 сентября 2013 г. (в редакции постановлений Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 г. № 335, от 02 августа 2016 г. № 748, от 29 мая 2017 г. № 650, от 28 августа 2017 г. № 1024 и от 01 октября 2018 г. № 1168), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 14.01.12 – Онкология.

Официальный оппонент,
заведующий лабораторией
регуляции экспрессии генов
ФГБУН «Институт цитологии РАН»,
доктор биологических наук,
профессор РАН

Дано свое согласие на сбор, обработку, хранение и передачу персональных данных в диссертационный совет Д 001.017.01 на базе ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России

Барлев Н.А.

Подпись доктора биологических наук Барлева Н.А. заверяю.



ЗАВЕРЯЮ
УЧЕНЫЙ СЕКРЕТАРЬ
ИНСТИТУТА ЦИТОЛОГИИ РАН, к.б.н.
ТЮРЯЕВА И.И.

15.06.2020

ФГБУН «Институт цитологии РАН»
194064, г.Санкт-Петербург,
Тихорецкий проспект 4,
тел.: +7 (812) 297-18-29;
e-mail: cellbio@incras.ru;
сайт <https://www.incras.ru/>