

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ФГБУ «РНЦРР»

Минздрава России

доктор медицинских наук,

профессор, академик РАН,


В. А. Солодкий

« 30 » июля 2024 г.



ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

федерального государственного бюджетного учреждения «Российский научный центр рентгенорадиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации о научно-практической значимости диссертации Еникеева Аделя Дамировича на тему «Роль белков CRABP и других компонентов сигнального пути ретиноевой кислоты в развитии резистентности опухолевых клеток к ретиноевой кислоте», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 3.1.6. Онкология, лучевая терапия.

Актуальность темы диссертации

Актуальность темы диссертационной работы Еникеева Аделя Дамировича не вызывает сомнений, поскольку она посвящена изучению одной из важнейших проблем клинической онкологии – формированию резистентности клеток злокачественных новообразований (ЗНО) к противоопухолевой терапии. Одним из потенциальных терапевтических агентов является ретиноевая кислота (РК), естественный метаболит, продукт внутриклеточного окисления ретинола, обладающий выраженной про-дифференцировочной и антипролиферативной активностью. Терапия на основе РК и других природных ретиноидов успешно применяется в лечении некоторых видов ЗНО, прежде всего лейкозов. Основной проблемой, ограничивающей применение данного вида терапии для лечения солидных опухолей, является быстрое приобретение резистентности. Несмотря на ряд имеющихся гипотез, в настоящее время нет полного

понимания причин и механизмов формирования устойчивости к ретиноевой кислоте. Работа Еникеева А.Д. направлена на выявление молекул ретиноид-зависимых сигнальных путей, участвующих в формировании резистентности к РК, анализу их влияния на малигнизацию клеток, рост и чувствительность к действию РК. Работа выполнена с использованием клеток ЗНО различного происхождения, при этом особое внимание уделено чувствительности/резистентности к РК клеток рака молочной железы. Для исследования данной проблемы автором использована экспериментальная модель, представленная десятью линиями клеток, на которых проводилось изучение механизмов действия ретиноевой кислоты и поиск молекулярных детерминант, участвующих в формировании резистентности.

Связь темы диссертации с планом научных работ

Диссертационная работа Еникеева Аделя Дамировича «Роль белков CRABP и других компонентов сигнального пути ретиноевой кислоты в развитии резистентности опухолевых клеток к ретиноевой кислоте» выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Тема диссертационной работы на соискание ученой степени кандидата биологических наук 3.1.6. Онкология, лучевая терапия утверждена на заседании Ученого совета НИИ Канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии имени Н.Н. Блохина» Минздрава России (протокол №1 от 22 января 2019 года).

Научная новизна исследования и полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

В диссертационной работе впервые проведено комплексное исследование чувствительности/ резистентности клеток злокачественных опухолей к действию ретиноевой кислоты (РК-чувствительность/резистентность) и

определение молекулярных факторов, определяющих формирование РК-резистентности. При этом показана корреляция РК-чувствительности/резистентности с экспрессией ядерных рецепторов *RAR α /RAR β* соответственно, а также с уровнем активации цитохромов *CYP26A1* и *CYP26B1*. Особое внимание уделено исследованию двух высокомолекулярных белков, связывающих ретиноевую кислоту, CRABP1 и CRABP2, участие которых в приобретении РК-резистентности ранее не исследовалось. В работе впервые показана ассоциация экспрессии CRABP1 с РК-чувствительностью для клеток ЗНО различного происхождения. Так, РК-чувствительные типы ЗНО, такие как нейробластомы, характеризуются высоким уровнем продукции CRABP1, в то время как в клетках РК-резистентных нозологий продукция данного белка практически отсутствует. Вместе с тем в клетках ЗНО, характеризующихся широким диапазоном РК-чувствительности/резистентности экспрессия данного белка сильно варьирует. Для подробного изучения этого вопроса использована экспериментальная модель, представленная десятью линиями клеток рака молочной железы (РМЖ), которые по результатам анализа ответа на РК были разделены на группы РК-чувствительных, средне-резистентных и полностью резистентных. Анализ CRABP1 показал, что в клетках РМЖ, сохраняющих РК-чувствительность, CRABP1 либо экспрессирован на высоком уровне, либо обратимо регулируется посредством метилирования. В то же время в максимально резистентных линиях экспрессия CRABP1 полностью блокирована с помощью нескольких механизмов эпигенетической регуляции на транскрипционном и посттранскрипционном уровнях.

Другими крайне важными и принципиально новыми результатами работы стало обнаружение регуляторной связи между белками CRABP1 и CRABP2 (CRABP2-зависимая регуляция CRABP1), а также определение их влияния на характеристики клеток, ассоциированные с опухолевой прогрессией, такие как

пролиферация и РК-резистентность. Полученные в работе результаты свидетельствуют о том, что во всех исследуемых клетках белки CRABP1 и CRABP2 оказывают противоположное влияние на обе изучаемые характеристики, причем направленность этого влияния меняется в процессе формирования резистентности и утрачивается в полностью резистентных клетках.

Значимость полученных результатов для науки и практики

Полученные результаты имеют важное фундаментальное значение в отношении изучения устройства внутриклеточной ретиноевой сигнализации, а также путей и механизмов развития резистентности к действию ретиноевой кислоты клетками ЗНО. Полученные результаты могут быть использованы в практической онкологии при выборе тактики лечения. В частности, для определения РК-чувствительности, предикции ответа клеток ЗНО и оценки возможности применения терапии на основе ретиноидов. Кроме того, обнаружение молекул, участвующих в регуляции РК-чувствительности/резистентности, открывает перспективы для разработки мишеней и новых подходов к терапии на основе ретиноидов в сочетании с таргетными препаратами, подавляющими формирование резистентности.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

Результаты диссертационной работы Еникеева А.Д. представляют интерес для специалистов в области фундаментальной и клинической онкологии, молекулярной и клеточной биологии. Основные положения и выводы работы опубликованы в ведущих профильных научных изданиях в открытом доступе и могут быть использованы отечественными и зарубежными исследователями для изучения вопросов внутриклеточной ретиноевой сигнализации и механизмов формирования клетками ЗНО резистентности к терапии на основе РК.

Разработанные методы оценки чувствительности клеток к РК, а также полученные экспериментальные модели на основе клеток рака молочной железы внедрены в планы НИР и используются в работе НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им.Н.Н.Блохина» Минздрава РФ. Полученные результаты могут быть использованы в клинической практике при выборе тактики лечения для оценки возможности включения в схему терапии препаратов на основе натуральных и синтетических ретиноидов.

Личный вклад автора

Автором самостоятельно выполнена теоретическая и экспериментальная часть работы, в частности, проведен анализ состояния проблемы, получены все первичные данные, проведены статистическая обработка и анализ полученных результатов. Автор принимал непосредственное участие в дизайне экспериментов, обобщении полученных результатов и их сопоставлении с литературными данными, подготовке материалов к публикации, написании статей и представлении результатов на научных мероприятиях. Написание и оформление диссертации и автореферата также выполнены автором лично.

Общая характеристика диссертационной работы

Диссертация Еникеева А.Д. построена по традиционному плану, изложена на 135 страницах машинописного текста и включает введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты, обсуждение результатов, заключение, выводы, список сокращений и условных обозначений, а также список литературы, включающий 255 литературных источников. Работа иллюстрирована 6 таблицами и 30 рисунками.

Во введении автором обосновывается актуальность тематики работы, кратко излагается состояние проблемы и обосновывается необходимость данного исследования и его новизна. В заключении данного раздела приводится формулировка цели и задач исследования, оценка теоретической и практической значимости работы, краткое описание материалов и методов

исследования, указываются положения, выносимые на защиту, степень достоверности и сведения об апробации результатов.

В разделе «Обзор литературы» представлен анализ современного состояния исследований в данной области. Автором проведен подробный анализ литературы по теме диссертации, рассмотрены существующие гипотезы, выявлены имеющиеся в литературных источниках противоречия и открытые вопросы, представлены собственные гипотезы, обосновывающие научную значимость проводимого исследования. Обзор написан логично, дает полную картину современных представлений по изучаемой проблеме, хорошо структурирован. Обзор написан достаточно подробно, хорошим литературным языком, не перегружен деталями и хорошо иллюстрирован. Данная глава состоит из 7 основных подразделов, в которых представлены сведения об устройстве ретиновой сигнализации, механизмах активности РК и принципах ее метаболизма, об участии ретиноидов в процессах канцерогенеза и опухолевой прогрессии. В главе рассматриваются успехи и сложности применения РК в терапии ЗНО, проблема возникновения РК-резистентности и имеющиеся гипотезы о причинах и механизмах данного явления. Особое внимание уделено некоторым белкам ретиновой сигнальной системы, включая ядерные рецепторы RAR, белки CRABP, цитохромы семейства CYP26 и другие молекулы, которые могут быть, по мнению автора, вовлечены в регуляцию РК-чувствительности, и являются предметом изучения данной работы. Отдельно анализируется относительно недавно обнаруженный феномен так называемой неканонической или негеномной активности РК, заключающейся в нетранскрипционной активации ряда сигнальных белков, играющих ключевую роль в малигнизации клеток, включая белки MAP-киназного и АКТ-зависимого сигнальных каскадов. Данный вопрос непосредственно связан с темой исследования, поскольку может представлять собой один из путей

формирования РК-резистентности, что также проверяется в экспериментальной части работы в качестве одной из гипотез.

В разделе «Материалы и методы исследования» описаны экспериментальные модели, а также методические подходы, использованные в работе, которые включают широкий спектр клеточных, молекулярно-биологических и генно-инженерных методик, а также методы статистического анализа. В целом, раздел свидетельствует о высоком методическом уровне работы и профессиональном уровне диссертанта.

Раздел «Результаты» описывает экспериментальные данные, полученные по нескольким направлениям исследований. Первой частью работы явилась разработка методов оценки РК-чувствительности и сравнительный анализ этой характеристики для клеток ЗНО различных нозологий. Проведенный далее анализ экспрессии CRABP1 в тех же клетках выявил ее связь с РК-чувствительностью данных нозологий. Для более детального анализа автором поставлена задача выбрать тип ЗНО, который бы обладал наиболее широким диапазоном чувствительности к РК. В качестве такой экспериментальной модели были выбраны клетки рака молочной железы (РМЖ), представленные 10-ю клеточными линиями. Автором проведено исследование РК-чувствительности клеток, по результатам которого линии достоверно разделились на несколько групп, для которых проводилось дальнейшее исследование, включающее механизм действия РК, сравнение продукции белков CRABP1 и CRABP2, анализ корреляции их экспрессии, анализ уровня метилирования гена *CRABP1*, а также исследование влияния CRABP2 на экспрессию CRABP1. В связи с тем, что в полностью РК-резистентных линиях РМЖ, как и в клетках других РК-резистентных типов ЗНО, автором показана полная репрессия *CRABP1* и *CRABP2*, в работе изучались механизмы эпигенетической регуляции экспрессии обоих генов. Для прямой оценки значения каждого из белков в формировании РК-резистентности, а также в

малигнизации клеток, автором с помощью методов направленной модификации экспрессии проведено исследование влияние продукции каждого из белков на скорость пролиферации и уровень РК-чувствительности клеток РМЖ, относящихся к различным группам. Отдельные разделы исследования посвящены анализу связи экспрессии ядерных рецепторов ретиноевой кислоты *RAR α* и *RAR β* , а также уровней РК-зависимой активации цитохромов *CYP26A1* и *CYP26B1* с РК-чувствительностью клеток РМЖ. В последнем подразделе данной главы проведено исследование неканонической активности РК в отношении нетранскрипционной активации протеинкиназ ERK1/2 и АКТ в клетках РК-чувствительных и РК-резистентных нозологий и анализ значения CRABP1 для ее реализации.

Раздел написан логично и последовательно - вновь полученные результаты обосновывают необходимость проведения последующих экспериментов. Следует отметить большой объем проведенных исследований, а также высокое качество иллюстративного материала.

Глава «Обсуждение результатов» содержит подробный анализ полученных экспериментальных данных, их интерпретацию и сопоставление с имеющимися литературными данными и современными представлениями о проблеме. В работе анализируются имеющиеся гипотезы и формулируются авторские гипотезы, обобщающие полученные данные. Эти обобщения иллюстрируются схемами, облегчающими восприятие материала в целом. Раздел написан хорошим литературным языком и представляет несомненный интерес в контексте интерпретации полученных данных.

В разделе «Заключение» подводятся итоги исследования, обобщаются основные полученные результаты, оценивается их значимость и перспективы дальнейших исследований. На основе полученных результатов сформулировано 7 выводов, которые в полной мере отражают результаты диссертационного исследования. Выводы четко сформулированы, полностью

соответствуют цели и задачам исследования. Список литературы представлен 255 статьями в отечественных и международных изданиях. Используемые в работе литературные источники по теме диссертации включают как классические работы по ретиноевой сигнализации, так и публикации последних лет.

Автореферат соответствует требованиям и отражает основное содержание диссертационной работы.

Принципиальных замечаний по диссертационной работе и вопросов к автору нет.


Заключение

Диссертационная работа Еникеева Аделя Дамировича на тему «Роль белков CRABP и других компонентов сигнального пути ретиноевой кислоты в развитии резистентности опухолевых клеток к ретиноевой кислоте» является научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований и разработок осуществлено решение актуальной научной задачи определения молекулярных факторов, задействованных в формировании резистентности опухолевых клеток к ретиноевой кислоте, имеющей значение для развития экспериментальной онкологии и решения проблемы формирования резистентности клеток злокачественных опухолей к противоопухолевой терапии, имеющей важное значение для фундаментальной онкологии.

По своей актуальности, научной новизне теоретической значимости, объему проведенного исследования, глубине анализа полученных данных и их достоверности, диссертационная работа Еникеева А.Д. соответствует всем требованиям пп. 9-14 «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 20 марта 2021 года №426, от 11 сентября 2021 г. №1539, от 26 октября 2023 г. №1786, от 25 января 2024г. №62), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор, Еникеев Адель Дамирович заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 3.1.6. Онкология, лучевая терапия.

Отзыв обсужден и одобрен на научной семинаре отдела молекулярной биологии и экспериментальной терапии опухолей федерального государственного бюджетного учреждения «Российский научный центр рентгенорадиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации «26» июля 2024__ года, протокол № 7 .

Заведующий научно-исследовательским отделом молекулярной биологии и экспериментальной терапии опухолей
ФГБУ «РНЦРР» Минздрава России
профессор, доктор медицинских наук (14.01.12 - Онкология) 
Боженко Владимир Константинович

Подпись д.м.н. В.К. Боженко «заверяю»

Ученый секретарь
ФГБУ «РНЦРР» Минздрава России
доктор медицинских наук,
профессор



Цаллагова Земфира Сергеевна

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научный центр рентгенорадиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации
117997, г. Москва, ул. Профсоюзная, д. 86
+7 (495) 333-91-20, mailbox@rncrr.ru, www.rncrr.ru