

УТВЕРЖДАЮ

Ректор

Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения
высшего образования «Казанский государственный медицинский университет»

Министерства здравоохранения Российской Федерации

Доктор медицинских наук, профессор

А.С. Созинов



А.С. Созинов

2019г.

ОТЗЫВ

Ведущей организации федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации о научно-практической ценности диссертации Лесовой Екатерины Андреевны «Модулирование активации глюкокортикоидного рецептора в химиотерапии гемобластозов», представленной на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 14.01.12 - онкология.

Актуальность темы диссертации

Злокачественные новообразования кроветворной системы являются широко распространенными онкологическими заболеваниями. Более 50% онкологических пациентов детского и юношеского возраста страдают именно этим заболеванием. Классическая терапия гемобластозов в качестве обязательного компонента включает в себя глюкокортикоиды, стероидные гормоны, играющие большую роль в регуляции роста и жизнедеятельности клеток различных типов. Противоопухолевый эффект глюкокортикоидов в терапии гемобластозов связан с их специфическим цитотоксическим действием на ряд клеток иммунной системы.

Однако вовлеченность рецептора глюкокортикоидов, основного физиологического медиатора действия данных гормонов, в регуляцию большого количества внутриклеточных сигнальных путей, приводит к тому, что использование глюкокортикоидов в схемах химиотерапии гемобластозов, помимо противоопухолевого действия, вызывает развитие целого ряда серьезных побочных эффектов, значительно ухудшающих качество жизни пациента даже при благополучном исходе лечения. Это в первую очередь связано с тем, что активированный глюкокортикоидный рецептор может регулировать экспрессию генов по двум принципиально разным механизмам – при прямом связывании с соответствующими сайтами в регуляторных районах генов (транс-активация), либо за счет белок-белкового взаимодействия с другими транскрипционными факторами и модуляции их действия (транс-репрессия).

Диссертационная работа Лесовой Е.А. посвящена изучению двух подходов к повышению безопасности и эффективности химиотерапии злокачественных новообразований кроветворной системы. Первый подход заключается в применении в качестве противоопухолевых агентов селективных агонистов глюкокортикоидного рецептора – низкомолекулярных соединений нестероидной структуры, способных связывать глюкокортикоидный рецептор, однако вызывать избирательный запуск только механизма транс-репрессии без индукции транс-активации, что ведет к уменьшению риска системных побочных эффектов при сохранении терапевтической активности. В мировой литературе описан ряд молекул, обладающих подобными свойствами, однако их применение в клинической практике, в частности, в онкологии, отмечено не было. Одним из препаратов класса селективных агонистов глюкокортикоидного рецептора является 2-(4-ацетоксифенил)-2-хлор-N-метилэтиламмоний хлорида (CpdA), соединение нестероидной структуры, обладающее сродством к глюкокортикоидному рецептору. Ранее были описаны его противовоспалительные свойства, сравнимые с действием глюкокортикоидов, однако в представленной работе впервые проведено исследование действия CpdA на активность глюкокортикоидного рецептора на моделях злокачественных новообразований

кроветворной системы. Более того, ввиду невысокой стабильности CpдA в водных растворах и канцерогенностью продуктов распада данной молекулы, актуальным является разработка подходов к получению более стабильных и/или более эффективных аналогов CpдA, а также исследованию эффектов CpдA в комбинации с другими противоопухолевыми препаратами. Другим актуальным подходом к снижению побочных эффектов при длительной терапии глюкокортикоидами является выявление ключевых генов, опосредующих развитие глюкокортикоид-зависимых осложнений, и дальнейшее таргетное подавление экспрессии и/или активности данных генов. В частности, автором на основании проанализированных данных литературы и собственных исследований был выбран ген *REDD1*, повышение экспрессии которого связывают с стероид-индуцированными атрофическими явлениями кожного покрова, мышечной и костной ткани. Поскольку ингибиторы экспрессии данного гена не описаны, то поиск соединений, обладающих подобной активностью является актуальной задачей современной экспериментальной онкологии.

Результаты, полученные в ходе работы, подтверждают гипотезу о возможности специфической активации транс-репрессорной активности глюкокортикоидного рецептора и снижения степени развития побочных эффектов глюкокортикоидов как с помощью лигандов селективного действия, так и путем регуляции экспрессии глюкокортикоид-зависимых генов, вовлеченных в развитие побочных эффектов стероидов. Более того, работа Е.А. Лесовой актуальна не только в плане практического исследования новых препаратов для химиотерапии злокачественных новообразований кроветворной системы. Она затрагивает важные фундаментальные вопросы, такие, как поиск эффекторов, вовлеченных в реализацию активности глюкокортикоидного рецептора и взаимодействие данного сигнального пути с другими каскадами внутриклеточной передачи сигнала, в частности, с сигнальным путем mTOR.

Учитывая все вышесказанное, можно с уверенностью утверждать, что задачи предпринятого Е.А. Лесовой исследования в области разработки подходов к модулированию функциональной активности глюкокортикоидного рецептора в

химиотерапии злокачественных новообразований кроветворной системы бесспорно актуальны. Все вышеперечисленное указывает на своевременность выполнения и актуальность диссертационной работы Лесовой Е.А., главной целью которого является повышение безопасности и эффективности химиотерапии гемобластозов.

Связь выполненной работы с планами соответствующих отраслей науки

Диссертационная работа Е.А. Лесовой «Модулирование активации глюкокортикоидного рецептора в химиотерапии гемобластозов» выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Новизна полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Научная новизна исследования обусловлена тем, что впервые изучены подходы к селективному модулированию функциональной активности глюкокортикоидного рецептора при злокачественных новообразованиях кроветворной системы. В частности, впервые продемонстрировано, что селективный агонист глюкокортикоидного рецептора $CpdA$ проявляет противоопухолевое действие *in vitro* и *in vivo* индивидуально и в комбинации с ингибитором протеасом бортезомибом на моделях лейкозов и лимфом. Впервые разработаны подходы к получению наночастиц золота из липопротеинов высокой плотности, загруженных $CpdA$, энантиомеров $CpdA$ и более стабильных химических производных $CpdA$. Автором впервые была проведена оценка биологических свойств полученных соединений и показано, что энантиомеры хирального соединения $CpdA$ также являются селективными агонистами глюкокортикоидного рецептора, избирательно активирующих только механизм транс-репрессии, причем их противоопухолевые и проапоптотические эффекты, а также влияние на транс-реессию и транс-активацию сопоставимы с действием рацемической смеси. При исследовании биологических эффектов химических производных $CpdA$ было впервые продемонстрировано, что противоопухолевый эффект ряда полученных химических производных преимущественно опосредован

активацией глюкокортикоидного рецептора по механизму транс-репрессии; наибольшую аффинность к глюкокортикоидному рецептору проявило соединение CpдA-03, что коррелировало с его наиболее выраженным противоопухолевым действием *in vitro* и *in vivo*. С помощью биоинформатического скрининга впервые было отобрано 9 зарегистрированных лекарственных препаратов, и продемонстрировано, что они подавляют как базальную, так и глюкокортикоид-индуцированную экспрессию гена *REDD1*, из которых наиболее активным является рапамицин. Впервые было показано, что рапамицин влияет на функциональную активность глюкокортикоидного рецептора, снижая глюкокортикоид-индуцированное фосфорилирование рецептора по остатку Ser211 и его глюкокортикоид-опосредованную транслокацию в ядро, а также подавляя запуск транс-активации; при этом степень запуска транс-репрессии либо не изменяется, либо усиливается. Также было продемонстрировано, что рапамицин в комбинации с дексаметазоном обладает синергическим противоопухолевым эффектом *in vitro* и *in vivo*, в то же время снижая степень глюкокортикоид-индуцированных побочных эффектов. Таким образом, в работе было показано, что модулирование функциональной активности глюкокортикоидного рецептора при терапии гемобластозов позволяет провести диссоциацию терапевтических и побочных эффектов на основе селективной активации механизма транс-репрессии путем использования селективных агонистов глюкокортикоидного рецептора или на основе избирательного ингибирования транс-активации путем подавления экспрессии его эфферентных генов.

Значимость полученных автором диссертации результатов для науки и производства

При выполнении данного исследования был получен ряд приоритетных данных. Было показано противоопухолевое действие селективного агониста глюкокортикоидного рецептора CpдA *in vitro* и *in vivo* индивидуально и в комбинации с ингибитором протеасом бортезомибом на моделях лейкозов и лимфом. В ходе исследования были разработаны стратегии синтеза аналогов селективного агониста глюкокортикоидного рецептора, и синтезированы 10 новых

соединений: энантиомеры CpдA и химические производные CpдA. Скрининг их биологических свойств показал, что антипролиферативное и проапоптотическое действие аналогов CpдA, их эффекты на индукцию транс-активации и транс-репрессии, а также аффинность к глюкокортикоидному рецептору сопоставимы с эффектами глюкокортикоидов и CpдA. Для наиболее активного производного CpдA-03 был продемонстрирован противоопухолевый эффект *in vivo*. Полученные данные свидетельствуют о том, что данное соединение является перспективным для дальнейшего введения его в доклинические испытания в качестве потенциального препарата для терапии злокачественных новообразований кроветворной системы.

Был проведен биоинформатический скрининг базы данных Connectivity Map и идентифицировано 9 потенциальных ингибиторов экспрессии гена *REDD1*, в том числе, ингибитор mTORC1 рапамицин, ингибитор mTORC1/mTORC2 OSI-027, а также модулятор холинорецепторов физостигмин. Рапамицин подавлял базальную и глюкокортикоид-индуцированную экспрессию *REDD1* и модулировал функциональную активность глюкокортикоидного рецептора, способствуя реализации терапевтических эффектов глюкокортикоидов, но в то же время подавляя развитие стероид-индуцированных побочных эффектов *in vitro* и *in vivo*. Полученные данные свидетельствуют о перспективности исследования эффектов ингибиторов *REDD1* на GR-зависимые сигнальные пути, и о высокой научно-практической значимости полученных результатов для повышения эффективности и безопасности химиотерапии гемобластозов.

Таким образом, представленная диссертационная работа имеет высокую научно-практическую значимость для современной онкологии и открывает новое перспективное научное направление по использованию молекулярных механизмов функционирования глюкокортикоидного рецептора для преодоления побочных эффектов глюкокортикоидной терапии путем избирательной активации транс-репрессорной функции глюкокортикоидного рецептора, которое не имеет аналогов в РФ и за рубежом.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

Положения, сформулированные в диссертации, относительно модулирования активности глюкокортикоидного рецептора путем использования препаратов класса селективных агонистов глюкокортикоидного рецептора, а также комбинированного использования глюкокортикоидов с ингибиторами экспрессии гена *REDD1*, открывают перспективы для введения разработанных подходов в клиническую практику, а также для дальнейших исследований методов повышения безопасности и эффективности глюкокортикоидной терапии злокачественных новообразований кроветворной системы. Результаты работы целесообразно использовать на практике для исследования новых лекарственных средств или при перепрофилировании зарегистрированных препаратов. Полученные в работе результаты являются обоснованием для разработки новых протоколов комбинированной химиотерапии гемобластозов. Результаты исследования и разработанные методические приемы рекомендуется применять в деятельности других научных коллективов при изучении механизмов действия ядерных рецепторов разных типов, частности, в лабораториях ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России, ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, ФГБУ «МНИОИ им. П.А. Герцена» Минздрава России, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава, Института молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта, а также Института биологии развития им. Н.К. Кольцова и некоторых других институтов. Рекомендовано использовать результаты исследования для подготовки учебных курсов кафедр онкологической и молекулярно-биологической специализации ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России, ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России и ряда других высших учебных заведений РФ.

Заключение

Диссертационная работа Лесовой Е.А. «Модулирование активации глюкокортикоидного рецептора в химиотерапии гемобластозов» является законченной научно-квалификационной работой, в которой сформулированы

научные и практические положения, совокупность которых может быть квалифицирована как крупное научное достижение в области фундаментальной онкологии. Представленная работа посвящена актуальной теме, представляет большой интерес как в научном плане, так и в практическом здравоохранении, и полностью 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 Лесовая Е.А. заслуживает присуждения искомой степени доктора биологических наук по специальности 14.01.12 – онкология.

Отзыв на диссертационную работу заслушан и утверждён на Ученом совете медико-биологического факультета ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России (протокол № 6-19 от 18 июня 2019 г.).

Заведующий кафедрой общей патологии,
доктор медицинских наук, профессор,
декан медико-биологического факультета
ФГБОУ ВО “Казанский ГМУ” Минздрава России

 Бойчук С.В.

Подпись заверяю

Ученый секретарь Ученого Совета
ФГБОУ ВО “Казанский ГМУ” Минздрава России
Доктор медицинских наук, профессор





Радченко О.Р.