

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

кандидата биологических наук, заведующего лабораторией молекулярной онкобиологии федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биологии гена Российской академии наук Татарского Виктора Вячеславовича на диссертационную работу Жидковой Екатерины Михайловны на тему «Молекулярные механизмы действия новых селективных агонистов глюкокортикоидного рецептора на клетки рака молочной железы», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 3.1.6. Онкология, лучевая терапия.

Актуальность темы исследования

Разработка новых препаратов для повышения эффективности и безопасности терапии рака молочной железы (РМЖ) остается актуальным направлением молекулярной онкологии ввиду широкой распространенности данной формы злокачественных новообразований в России и мире. Глюкокортикоиды часто используются в комбинированной терапии РМЖ. Они применяются для улучшения общего состояния больных, проходящих курсы химио- и радиотерапии. В то же время при длительных курсах приема у пациентов проявляются существенные побочные эффекты глюкокортикоидной терапии. Для данного класса препаратов описана их роль в опухолевой прогрессии и метастазировании РМЖ, в связи с чем работа Жидковой Екатерины Михайловны, посвященная исследованию селективных агонистов рецептора глюкокортикоидов на моделях РМЖ *in vitro* является крайне актуальной.

Научная новизна

Жидковой Е.М. проведено исследование молекулярных механизмов действия новых селективных агонистов глюкокортикоидного рецептора (SEGRA) на клетки РМЖ. В ходе работы автором было доказано, что новый препарат SpdA-03 обладает высокой аффинностью к рецептору глюкокортикоидов в клетках. Также автором была продемонстрирована стабильность раствора SpdA-03 в различных условиях. Впервые на ряде модельных линий клеток РМЖ с было

проведено сравнение антипролиферативных эффектов нового соединения SpdA-03 с глюкокортикоидом дексаметазоном и известным SEGRA SpdA. Обнаружена корреляция цитостатических эффектов исследуемых соединений с уровнем экспрессии рецептора. Впервые показано, что SEGRA не вызывают ядерной транслокации рецептора и регулируют экспрессию глюкокортикоид-респонсивных генов в клетках РМЖ. Впервые показано, что глюкокортикоид дексаметазон оказывает стимулирующее влияние на миграцию клеток РМЖ. В этой связи актуальность и научная новизна, а также практическая значимость исследования не вызывают сомнений.

Обоснованность и достоверность полученных результатов, выводов и практических рекомендаций

В ходе диссертационного исследования Жидковой Е.М. были использованы общепринятые методы молекулярной биологии. Все клеточные модели, использованные в работе, широко применяются в качестве экспериментальных модельных систем в фундаментальных и прикладных исследованиях в области молекулярной онкологии. Использование комбинаций методов, взаимоподтверждающих наблюдаемые эффекты, позволило получить достоверные и однозначно интерпретируемые результаты, которые убедительно доказывают обоснованность сделанных выводов.

Структура и содержание диссертации / оценка содержания диссертации

Диссертация Жидковой Е.М. написана по традиционному стилю, изложена на 140 страницах печатного текста, иллюстрирована 6 таблицами и 32 рисунками. Структура диссертации включает главы введения, обзора литературы, описания методических подходов, анализа и обсуждения полученных результатов, заключения, выводов, списка условных сокращений и списка литературы, который включает 417 литературных источников.

Во **введении** автор диссертации обосновывает актуальность и степень разработанности проблемы, описывает научную новизну, теоретическую и практическую значимость работы формулирует цель и задачи исследования.

В литературном обзоре (Глава 1) представлены статистические данные заболеваемости и смертности от РМЖ в России, дано описание молекулярной классификации РМЖ. Данные иллюстрированы наглядными диаграммами и таблицами. Один из подразделов обзора содержит информацию о молекулярных механизмах метастазирования РМЖ. Далее описаны механизмы действия глюкокортикоидов и их роль в регуляции сигнальных путей в клетках, взаимодействие рецептора глюкокортикоидов с другими клеточными рецепторами, играющими роль в прогрессии РМЖ. Кроме того, описаны молекулярные механизмы, опосредующие реализацию терапевтических и побочных эффектов глюкокортикоидов. Отдельный раздел обобщает литературные данные о роли активации рецептора глюкокортикоидов в прогрессии РМЖ. В последнем разделе литературного обзора описаны механизмы действия известных препаратов SEGRA. Раздел написан грамотным русским языком и прекрасно иллюстрирован. Особенно хочется отметить большое количество ссылок, в том числе и на новейшие научные исследования.

В Главе 2 представлено описание методов исследования. Следует отметить, что автором использован широкий набор молекулярно-биологических методов, свидетельствующих о высоком методическом уровне работы.

В целом раздел содержит подробную информацию об экспериментальных подходах, методики воспроизводимы, что подтверждает адекватность их выбора для реализации поставленных задач. Методы достаточно подробно описаны, для их независимого воспроизведения.

Третья глава содержит результаты собственных исследований. Данная глава хорошо структурирована, иллюстрации информативны и позволяют провести оценку полученных результатов. В начале работы автор показывает, что CpдA-03 конкурентно связывается с глюкокортикоидным рецептором со сравнимой константой связывания, в то время как исходный CpдA обладает гораздо меньшей эффективностью. Автор также показывает гораздо большую стабильность CpдA-03 по сравнению с исходным CpдA. Затем в диссертации анализируется антипролиферативный эффект дексаметазона, CpдA и CpдA-03, и

показано, что они обладают GR-зависимым антипролиферативным эффектом, однако эффективность препаратов различается для разных линий – дексаметазон наиболее эффективен для линии MCF7, CpдA для MDA-MB-231, а CpдA-03 для MDA-MB-453. При этом часть антипролиферативного эффекта CpдA-03 является независимой от GR, т.к. снижение уровня GR не оказывает влияние на такой эффект. Автор затем анализирует эффект на клеточный цикл и показывает, статистически достоверные отличия для CpдA-03 в линии MCF7 и MDA-MB-231, для дексаметазона в MDA-MB-231 и для CpдA в MDA-MB-453. Также анализируется влияние препаратов на экспрессию циклинов типа D, где показано увеличение их экспрессии от CpдA-03 в линии MDA-MB-231, и для циклина D3 в линии MCF7. Интерпретация этого результата затруднена без анализа экспрессии других циклинов, и может свидетельствовать о G1 блоке или наоборот об увеличении вхождения клеток в цикл.

В следующем разделе автор анализирует влияние препаратов на активацию GR рецептора. Показано, что увеличение ядерной фракции происходит в клетках MCF7 и MDA-MB-231 для дексаметазона, и для MCF7 для CpдA-03, но не для CpдA. При этом увеличение фосфорилирования происходит только для дексаметазона. Экспрессия GR-зависимых генов - *FKBP51* и *GILZ* было показано только для дексаметазона, и *DDIT4* для дексаметазона, и CpдA-03 на 24 часа в MCF7. В общем CpдA-03 и CpдA продемонстрировали значительное снижение трансактивации рецептора. Затем было проанализировано влияние соединений на уровень экспрессии 86 GR респонсивных генов. Дексаметазон увеличивал экспрессию GR-зависимых генов в MDA-MB-231, но в меньшей степени в MCF7. CpдA оказывал выраженное ингибирующее действие в линии MDA-MB-231, в то время как CpдA-03 в этой линии разнонаправленно регулировал экспрессию генов, снижая экспрессию генов-регуляторов адгезии, передачи сигнала и факторов транскрипции. Анализ трансрепрессорного потенциала соединений показал, что CpдA и CpдA-03 оказывают выраженное трансрепрессорное действие в MCF7 и MDA-MB-231, в то время как дексаметазон подавляет активность NF-κB в MCF7, но активирует ее в MDA-MB-231. В то же время при анализе экспрессии цитокинов

было показано, что CpдA-03 стимулирует их продукцию в MCF7, но не в MDA-MB-231, в то время как дексаметазон, наоборот стимулирует продукцию в MDA-MB-231, но не в MCF7.

В следующем разделе была проанализирована миграционная способность клеток, обработанных изучаемыми соединениями. Было показано, что от дексаметазона статистически достоверно увеличивается скорость миграции клеток в тесте на застывание раны в клетках MCF7. Для других соединений не было показано статистически достоверных различий, хотя наблюдался тренд на увеличение скорости миграции от CpдA-03. Степень миграции клеток через камеру Бойдена была снижена для CpдA-03 и дексаметазона в клетках MCF7 и увеличена от дексаметазона в клетках MDA-MB-231. Все изученные лиганды не оказывали влияние на целостность щелевых контактов. При этом дексаметазон, но не CpдA и CpдA-03 снижал экспрессию генов, регулирующих адгерентные, плотные, щелевые контакты и десмосомы, а также генов металлопротеиназ 9 и 13 в линии MCF7.

Достоверность результатов, изложенных в работе автора, не вызывает сомнений и убедительно доказывает обоснованность сделанных выводов.

Глава 4 содержит обобщенное обсуждение полученных результатов исследования. Автор проводит сравнения собственных данных с данными литературы, описывает выявленные корреляции.

В разделе **Заключение** автором обобщены основные результаты проведенного исследования, обозначена практическая и теоретическая значимость полученных данных.

В работе содержатся 7 **выводов**, которые соотносятся с задачами и отражают полученные результаты исследования.

К работе имеется ряд замечаний и вопросов:

- Рисунки целесообразно подписывать сначала номером рисунка, а потом описанием.
- На рисунке 16 на микрофотографиях необходимо указать окраску и размерную шкалу. Для графиков указать статистическую значимость отличий.

- На всех рисунках необходимо указать тип анализа статистической значимости.

- Необходимо с осторожностью делать выводы о действии препаратов на «люминальный» и «тройной негативный РМЖ» на основании сравнения всего двух клеточных линий, которые отличаются и по многим другим параметрам. Такие выводы были бы значительно усилены анализом нескольких ключевых генов в большем количестве линий разного подтипа.

- На рисунке 17 дексаметазон оказывает наибольшее влияние на большинство клеточных типов, особенно на MCF7, в то время как на рисунке 18 его влияние на распределение в клеточном цикле невелико. С чем могут быть связаны такие различия?

- На рисунке 19 для клеток MDA-MB-231 большинство CpdA и CpdA-03 увеличивают экспрессию циклина D3. Не должно ли такое действие увеличить пролиферативный потенциал такой опухоли?

- Проверялись ли CpdA и CpdA-03 на клетках с низкой экспрессией GR?

- CpdA-03 обладает более низкой цитостатической активностью в клетках MCF7 и увеличивает экспрессию цитокинов в этой линии. Значит ли это что применение этого препарата целесообразно только в линиях без экспрессии ERalpha?

- Проверялось ли совместное действие Dex, CpdA и CpdA-03 вместе с химиотерапевтическими препаратами?

Сделанные по ходу рецензии замечания не снижают научной ценности и практической значимости исследования, проведенного Е. М. Жидковой.

Заключение

Диссертационная работа Жидковой Екатерины Михайловны на тему «Молекулярные механизмы действия новых селективных агонистов глюкокортикоидного рецептора на клетки рака молочной железы» является научно-квалификационной работой, имеющей значение для повышения качества терапии больных с опухолями молочной железы, а также развития молекулярной

онкологии. Диссертационная работа 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 г. №426, от 11 сентября 2021 г. №1539, от 26 октября 2023 г. №1786, от 25 января 2024 г. №62), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 3.1.6. Онкология, лучевая терапия.

Даю согласие на сбор, обработку, хранение и передачу персональных данных в диссертационный совет 21.1.032.01, созданного на базе ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России

Официальный оппонент

Кандидат биологических наук
14.01.12 - Онкология (3.1.6. Онкология,
лучевая терапия в действующей
номенклатуре научных специальностей)
Заведующий лабораторией молекулярной онкобиологии
ФГБУН Институт биологии гена
Российской академии наук

В.В.

Татарский Виктор Вячеславович

12.02.2025г.

Подпись Татарского В.В. заверяю

Ученый секретарь
ФГБУН Институт биологии гена
Российской академии наук
Доктор биологических наук



Набирочкина Елена Николаевна

ФГБУН Институт биологии гена Российской академии наук Адрес: 119334, г. Москва, ул. Вавилова, д. 34/5. Тел. +7(499)135-60-89, e-mail: info@genebiology.ru