

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора медицинских наук, профессора, заслуженного врача России, руководителя отдела молекулярной диагностики и экспериментальной терапии опухолей Федерального государственного бюджетного учреждения «Российский научный центр рентгенорадиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации Боженко Владимира Константиновича на диссертационную работу Оглоблиной Анны Максимовны «Мультитаргетные эффекты G4-аптамеров и их противоопухолевая активность *in vitro*», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 3.1.6. Онкология, лучевая терапия.

Актуальность темы исследования

Темой диссертационной работы А.М. Оглоблиной является изучение механизмов действия G4-аптамеров в качестве потенциальных противоопухолевых препаратов.

Разработка инновационных противоопухолевых препаратов с таргетным действием на основе аптамеров является одним из перспективных направлений фармацевтики в 21 веке. В геноме клетки содержится около 500 тысяч гуанин-богатых последовательностей, способных формировать G-квадруплексы (G4), которые могут распознавать различные клеточные мишени. Использование экзогенного введения аналогичных последовательностей олигонуклеотидов приводит к специальному воздействию на необходимую мишень. Ряд аптамеров, основным структурным элементом которых являются G4 структуры, к настоящему моменту проходят клинические исследования в качестве противоопухолевых препаратов для злокачественных новообразований различных нозологических форм, и продолжается разработка G4-образующих аптамеров, ингибиторющее действие которых направлено более чем на 10 белков-мишений для противоопухолевой терапии.

Однако наличие схожих структурных элементов, свойственных всем G4-

аптамерам, позволяет предположить плейотропный характер их действия в отношении G4-распознающих белков клетки. Работ по изучению перекрестного взаимодействия G4-аптамеров с различными G4-распознающими белками до настоящего времени опубликовано не было. Отличительные свойства G4-аптамеров: высокая скорость и низкая себестоимость синтеза, низкая иммуногенность по сравнению с моноклинальными антителами и высокая стабильность позволяют отнести G4-аптамеры к потенциально перспективным противоопухолевым препаратам, а изучение их механизмов действия в клетке – к актуальным исследованиям в области экспериментальной онкологии.

Таким образом, работа Оглоблиной Анны Максимовны, несомненно, является актуальной.

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

Выбор адекватных методов исследования, качество проведения экспериментов, наличие всех необходимых контролей и, наконец, объем исследования достаточны для решения задач, поставленных в работе и обоснования положений и выводов, сформулированных в диссертации.

Для обработки собранных данных были использованы современные подходы математической статистики. Полученные данные хорошо согласуются с отдельными опубликованными экспериментальными данными изучения G4-аптамеров. Выводы работы полностью соответствуют полученным результатам и хорошо согласуются с современными представлениями о структурных характеристиках G-квадруплексов.

Достоверность и новизна научных положений, выводов и рекомендаций

Применение для обработки полученных данных современных методов

математической статистики и соответствие полученных результатов отдельным опубликованным работам предклинических исследований G4-аптамеров свидетельствует об их достоверности.

Гипотеза о возможности взаимодействия G4-аптамера не только с белком, для ингибиования которого он был разработан, но и с другими белками, обладающими сродством к структурам такого типа, впервые была выдвинута и экспериментально доказана в представленном исследовании, что подтверждает высокую теоретическую значимость работы Оглоблиной А.М. Представленная работа расширяет наши представления о механизмах функционирования G4 в клетке и свидетельствует о высоком потенциале использования G4-аптамеров в качестве мультитаргетных противоопухолевых агентов.

Кроме того, Оглоблиной А.М. представлены и другие результаты, обладающие научной новизной: впервые показано наличие в геноме целого ряда одинаковых G4-мотивов, избирательность цитотоксического действия аптамеров в отношении опухолевых клеток, перекрестное распознавание G4 белками STAT3, TOP1, SP-1 и др.

Данное исследование обладает высокой практической значимостью, так как будет способствовать развитию использования G4- аптамеров в качестве мультитаргетных противоопухолевых препаратов. При этом, полученные Оглоблиной А.М. данные об избирательности цитотоксического действия изучаемых G4-аптамеров на опухолевые клетки можно отнести к результатам, имеющим большое практическое значение.

Оценка содержания диссертации

Диссертация построена по классическому плану и включает Введение, Обзор литературы, главу Материалов и методов, Результаты собственных

экспериментов и их обсуждение, Заключения и Выводы. Работа изложена на 139 страницах, включает 14 таблиц, 28 рисунков и 253 ссылки на литературные источники, включая публикации последних лет, а также одно приложение.

«Обзор литературы» состоит из 5 разделов, в которых рассмотрены структурные особенности G-квадруплексов, локализация G4-мотивов в геноме и транскриптоме, взаимодействие с G4-распознающими белками, а также приведено описание G4-аптамеров, разработанных к целевым белкам-потенциальным мишениям противоопухолевой терапии. Обзор написан литературным языком, содержит иллюстрации и таблицы, облегчающие понимание представленного материала.

Глава «Материалы и методы» содержит исчерпывающее изложение всех использованных методик. В работе использован широкий арсенал современных физико-химических и молекулярно-биологических методов, в том числе: метод кругового дихроизма, анализ с применением люциферазного репортера, определение топоизомерной активности, методы определения цитотоксичности, методы трансдукции с использованием вирусных частиц и другие методы.

Глава «Результаты исследования» включает несколько разделов. Стратегия исследования обосновывается в первом разделе. Далее следует раздел, в котором автор проводит анализ существующих алгоритмов биоинформационного скрининга наличия G4-мотивов в геноме человека с целью выбрать оптимальный метод в рамках представленного исследования. Третий раздел посвящен биоинформационическому поиску наиболее распространенных G4-мотивов в геноме человека. Выявлены 10 наиболее распространенных G4-мотивов в геноме человека, последовательность каждого из которых предшествует последовательности целого ряда генов, что позволяет предположить наличие кластерной регуляции генов за счет

модулирования состояния G4-мотивов в ядре клетки. В четвертом разделе автор анализирует методом кругового дихроизма структуру каждого G4-аптамера из выбранного пула и выделяет, среди исследуемых G4-аптамеров, параллельные, антипараллельные, смешанные подгруппы на основе их структуры. Далее А.М Оглоблиной описан эффект подавления активности топоизомеразы I, ингибирования транскрипционного фактора Stat3 G4-аптамерами, эффект подавления процесса синтеза ДНК *de novo* в клетках MCF-7, и продемонстрированы соответствия между структурой G4-аптамеров и их биологической активностью. В заключительном разделе данной главы описаны результаты эксперимента, который продемонстрировал более сильный цитостатический эффект G4-аптамеров на клетки аденокарциномы молочной железы MCF-7 по сравнению с эффектом на условно-нормальные иммортилизованные клетки эпителия молочной железы MCF-10A.

В главе «Обсуждение результатов» А.М. Оглоблина анализирует полученные данные и сравнивает их с научными работами, опубликованными в рецензируемых научных изданиях. В результате данного анализа автор выделяет группу наиболее биологически активных G4-аптамеров (As-GGG, G4-STAT3, G4-TGT, G4-CCC, AS1411 и G4-SHP2), а также подтверждает плейотропный механизм действия G4-аптамеров.

Полученные данные интересны и важны не только с фундаментальной, но и с практической точки зрения, т.к. в ходе работы получены конкретные последовательности, имеющие выраженный, избирательный цитотоксический эффект на опухолевые клетки. Автором выполнено законченное исследование, все поставленные задачи решены, цель работы успешно достигнута.

Результаты опубликованы в 11 публикациях, среди которых 6 статей в журналах перечня ВАК, 3 из которых в журнале 1ого квартиля библиографической и реферативной базы SCOPUS.

Замечания по диссертации

В качестве замечаний по тексту диссертации могу отметить следующее:

Во-первых, некоторые неточности оформительского характера. Так, на рисунке 21 указаны А и Б панели, а в подписи присутствует описание с указанием панели А, на рисунке 23, наоборот, не указаны панели А и Б, описание которых приведено в подписи к рисунку, в описании таблицы 10 указано, что аптамеры приведены в порядке уменьшения цитотоксической концентрации, хотя использован противоположный подход, т.е. возрастания цитотоксической концентрации, что соответствует уменьшению цитотоксичности. Кроме того, в тексте диссертации встречаются отдельные стилистически некорректные фразы, например: «...на основе анализа существующих методов биоинформационического анализа ...».

Во-вторых, В разделе материалы и метода в подразделе «список используемых в работе реагентов» приведены и приборы, при этом указаны не все приборы, которые были использованы в исследовании.

В-третьих, несколько неточна формулировка первой части 5 вывода: «Преимущественной конформацией биологически активных G4-аптамеров является параллельная». Автор, по-видимому, имела в виду не вообще биологическую активность G4-аптамеров, а изучаемых в ее исследовании аптамеров, предлагаемых в качестве противоопухолевых агентов. Об этом должно было быть сказано в выводе более определенно.

Однако данные замечания не могут влиять на общую оценку диссертационной работы.

Заключение

Таким образом, диссертационная работа Оглоблиной Анны Максимовны на тему «Мультитаргетные эффекты G4-аптамеров и их противоопухолевая активность *in vitro*» является законченной, самостоятельной научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований осуществлено решение актуальной задачи – установления плейотропного механизма действия G4-аптамеров, имеющей существенное значение для онкологии. По актуальности, научной и практической ценности полученных результатов диссертация 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), 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.

Руководитель отдела молекулярной диагностики и экспериментальной терапии опухолей

ФГБУ «Российский научный центр рентгенорадиологии»

Министерства здравоохранения Российской Федерации

доктор медицинских наук, профессор, заслуженный врач России, (14.00.14 – онкология (медицина))

Боженко Владимир Константинович

Боженко

10.06.2022г.

Подпись д.м.н., профессора Боженко В.К. заверяю.

Ученый секретарь

ФГБУ «Российский научный центр рентгенорадиологии»

Министерства здравоохранения Российской Федерации

д.м.н., профессор Цаллагова Земфира Сергеевна



Цаллагова

ФГБУ «Российский научный центр рентгенорадиологии»

Министерства здравоохранения Российской Федерации

117997, г. Москва, ул. Профсоюзная, д. 86,

<https://www.rncrr.ru>,

E-mail: mailbox@rncrr.ru