

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

Доктора биологических наук, профессора, руководителя лаборатории прогноза консервативного лечения МНИОИ им. П.А. Герцена – филиала ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, Сергеевой Натальи Сергеевны на диссертационную работу Еникеева Аделя Дамировича «Роль белков CRABP и других компонентов сигнального пути ретиноевой кислоты в развитии резистентности опухолевых клеток к ретиноевой кислоте» представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 3.1.6. Онкология, лучевая терапия.

Актуальность темы исследования

Введение в онкологическую практику таргетной и иммунотерапии существенно изменило тактику лечения онкологических больных. В то же время, учитывая сравнительно высокий процент больных с распространенным опухолевым процессом, химиотерапия (ХТ) прочно удерживает свои позиции в онкологии.

Спектр химиотерапевтических препаратов огромен. И наряду с синтетическими веществами, для лечения больных со злокачественными новообразованиями широко используются и соединения природного происхождения. Одним из них является ретиноевая кислота (РК) – естественный метаболит витамина А (ретинола). В клинике она используется при лечении лимфопролиферативных заболеваний, в частности, промиелоцитарного лейкоза. В то же время идут клинические исследования возможностей её использования в ХТ целого спектра солидных злокачественных опухолей.

Проблемой, ограничивающей длительное использование химиопрепаратов, наряду с токсичностью, является развитие резистентности к ним опухолевых клеток. Механизмы ее развития, возможные пути предотвращения и преодоления активно изучаются в экспериментальных исследованиях.

Особенностью РК, как химиотерапевтического средства, является её природный характер. У всех хордовых животных её транс-форма в качестве обязательного компонента включена в целый спектр процессов органогенеза в эмбриогенезе, участвуя в процессах эмбриональной индукции и контролируя дифференцировку клеток разных типов. РК участвует в контроле дифференцировки клеток разных типов и во взрослом состоянии. Индуцируя дифференцировку, РК блокирует пролиферацию клеток, и, с этих позиций, может рассматриваться как антипролиферативный агент, что привело к её использованию в онкологической клинике.

Поскольку первые хордовые появились на Земле более 500 млн. лет назад, то очевидно, что на протяжении этих миллионов лет по мере усложнения животных шло становление механизмов действия веществ природного происхождения, попадающих в организм, и их метаболитов, а также становление механизмов, обеспечивающих, при необходимости, деактивирование (в самом общем смысле) этих веществ, что и означает становление механизмов резистентности клеток к ним.

Именно поэтому изучение механизмов резистентности опухолевых клеток к РК-метаболиту витамина А, активно включенному в метаболизм разных тканей на разных этапах онтогенеза (от эмбриогенеза – до конца жизни) является архисложной задачей. Очевидно, что становление тонких механизмов регуляции активности РК потребовало в эволюции привлечения целого ряда сигнальных путей и сигнальных молекул с прямыми и реципрокными взаимоотношениями. А поскольку обсуждаемый дериват витамина А – РК – обладает свойствами цитостатика и используется в онкологии, это направление исследований является крайне актуальным.

Научная новизна результатов исследования и их значимость для науки и практики

В работе получен ряд принципиально новых результатов, касающихся РК-сигналинга, и, как следствие, механизма регуляции и подавления этого сигналинга, что и означает формирование резистентности. Так, показана роль

2-х связывающих РК белков CRABP1 и CRABP2 в чувствительности и приобретении резистентности клеток к РК. Установлена взаимная регуляция этих белков. Обнаружена взаимосвязь степени экспрессии ядерных рецепторов RAR α и β , а также цитохромов, метаболизирующих РК, с чувствительностью и резистентностью клеток к РК. Показана взаимосвязь РК с известными сигнальными путями канцерогенеза ERK1/2 и АКТ. Исследованы звенья эпигенетической регуляции активности РК. То есть изучены все критические для формирования резистентности связи РК. Это позволило сформулировать механизм становления резистентности опухолевых клеток к РК.

Практическая значимость полученных результатов также очевидна: исследование создало базис для разработки агентов, селективно подавляющих процесс становления резистентности опухолевых клеток к РК, и, тем самым, обеспечивающих реализацию её цитостатических свойств.

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

Результаты исследования, выводы, положения, выносимые на защиту, обоснованы огромным количеством корректно выполненных исследований, включая современную статистическую обработку данных.

Работа содержит достаточное количество иллюстративного материала (6 таблиц и 30 рисунков), а также сопоставление результатов собственного исследования с данными других авторов (во всех разделах работы), что позволяет считать результаты выполненной работы и сделанных на её основе заключений и выводов, достоверными.

Оценка содержания и завершенности диссертации

Диссертация Еникеева Аделя Дамировича выполнена и оформлена в соответствии с требованиями ВАК при Минобрнауки России ГОСТ Р7.0.11.-2011, написана в классическом стиле и состоит из введения, обзора литературы, глав «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение полученных результатов», «Заключение», «Выводы», содержит «Список сокращений и условных обозначений» и «Список литературы». Общий объем

диссертации – 140 страниц машинописного текста. Текст иллюстрирован 6 таблицами и 30 рисунками. Список литературы включает 255 источников.

Прежде всего, хотелось бы отметить, что работа написана хорошим языком и очень аккуратно оформлена.

Во введении автор кратко обосновывает актуальность исследования с привлечением данных литературы, что позволяет оценить степень разработанности проблемы в мире. В этом разделе сформулирована цель, задачи исследования, положения, выносимые на защиту, научная новизна и потенциальная практическая значимость работы. Замечание: в одноименном разделе автореферата, к сожалению, отсутствуют ссылки на литературу. Замечание не принципиальное, так как очевидно, что при изложении разработанности проблемы автор анализировал литературу, так как во введении к диссертации ссылки есть.

Глава 1. «Обзор литературы».

Его объем 36 страниц и, как отмечено ранее, к его написанию привлечено 255 источников литературы. В обзоре достаточно полно суммированы и обсуждены данные, касающиеся всех аспектов собственной работы. Логика написания обзора и изложения собственных результатов совпадает. И, таким образом, в главах собственных результатов автор излагает свои данные, дополняющие имеющиеся в литературе. Такой стиль изложения является безусловной сильной стороной оппонируемой работы. Обзор полностью обосновывает цель и задачи исследования.

Замечаний к этому разделу диссертации нет.

Глава «Материалы и методы». В этом разделе подробно изложены использованные экспериментальные модели, методики и приемы, что позволяет, при необходимости, воспроизвести эксперименты. Спектр использованных моделей и методов огромен – это и методы молекулярной биологии, биохимические, культуральной работы. Статистическая обработка выполнена с помощью адекватных современных алгоритмов. Замечаний к этому разделу нет.

Глава «Результаты исследования». Она состоит из 5 подглав.

На первом этапе автор определил чувствительность спектра опухолевых линий (включая целые панели модификации одной линии, в том числе РМЖ) к трансРК. Это позволило сформировать ряды клеточных культур (в том числе в рамках одной нозологической формы) по убыванию чувствительности (то есть нарастанию резистентности) к РК.

Вопрос: «Как Вы полагаете, механизмы исходной и приобретенной резистентности клеток к РК одинаковы?»

Далее диссертант установил, что степень чувствительности опухолевых линий в панели клеточных культур в определенной степени коррелирует с экспрессией цитоплазматического белка CRABP1, способного связывать РК.

Далее автор расположил клеточные линии в ряд по убыванию чувствительности к РК, воздействовал на опухолевые клетки РК и установил, что РК обладает цитостатическими (но не цитотоксическими) свойствами, блокируя пролиферацию опухолевых клеток путем их остановки в G₁ фазе клеточного цикла.

Вопрос: «Является ли этот блок пролиферации обратимым?»

Далее соискатель установил CRABP-2-зависимую регуляцию экспрессии CRABP-1, то есть новый механизм регуляции количества РК-связывающих белков. Еще один новый факт: отсутствие корреляции между уровнем CRABP-1 и его мРНК (в отличие от CRABP-2). Для ответа на вопрос, с чем это может быть связано, и в чем биологическая роль этого явления, авторы провели анализ влияния метилирования/деметиления ДНК и ингибирование деацетилирования гистонов. В результате был установлен эпигенетический механизм экспрессии белка CRABP-1, который оказался различным в РК-чувствительных и резистентных клеточных линиях. Тогда автор подошел к выяснению вопроса о механизмах резистентности опухолевых клеток к РК «с другой стороны»: исследовал роль белков CRABP 1/2 в регуляции пролиферации и чувствительности клеточных линий к РК (на модели РМЖ). На основании полученных данных автор выдвинул гипотезу, что CRABP-1 ограничивает

биодоступность РК для ядра, секвестрируя её в цитоплазме, в отличие от белка CRABP-2, который является своеобразным опухолевым супрессором и реализует антипролиферативную активность РК.

Далее проведен анализ экспрессии ядерных рецепторов РК ($RAR\alpha$ и β) в линиях РМЖ с разной чувствительностью к РК и установлен один из возможных механизмов резистентности к РК: с повышением уровня резистентности в ряду клеточных линий снижался уровень рецепторов $RAR\alpha$ и повышался $RAR\beta$.

Далее А.Д.Еникеев исследовал экспрессию цитохромов, катаболизирующих РК в клетках РМЖ с разным уровнем чувствительности к РК. Установлено, что формирование резистентности сопровождается не только снижением ядерных рецепторов РК – $RAR\alpha$, но и понижением экспрессии соответствующих цитохромов, что и ограничивает транскрипционную активность РК.

На завершающем этапе экспериментов соискатель исследовал неканоническую активность РК, а именно, активацию протеинкиназ АКТ и ERK1/2–сигнальных путей, являющихся ключевыми регуляторами опухолевой прогрессии. Обнаружена их быстрая активация при добавлении РК, которая наблюдалась в клеточных линиях с разным уровнем чувствительности к РК и разным уровнем РК-связывающего белка CRABP-1.

К разделу «Результаты» замечаний нет.

Учитывая, что РК является естественным метаболитом в организме человека, в перспективе было бы интересно посмотреть механизмы регуляции РК в условно нормальных клеточных линиях стволовых и дифференцированных клеток.

Раздел «Обсуждение результатов» демонстрирует глубокое знание соискателем литературы, способность к глубокому анализу. В результате выполненной работы автор создал достаточно стройную гипотезу о механизмах формирования резистентности опухолевых клеток к РК, включающую несколько лишь частично связанных звеньев – нарушение сигналинга РК, ограничение её доступа в ядро и активация ее катаболизма.

В целом работа очень стройная, логичная, законченная.

Подтверждение опубликований основных результатов диссертации в научной печати

Результаты диссертационной работы Еникеева А.Д. отражены в 7 публикациях, 3 из которых – в журналах, рекомендованных ВАК РФ. Опубликованные работы в достаточной мере отражают основное содержание диссертационного исследования.

Соответствие содержания автореферата основным положениям диссертации

Автореферат оформлен в соответствии с требованиями, предъявляемыми к авторефератам, и в кратком изложении содержит все основные результаты диссертационной работы.

Принципиальных замечаний по содержанию и оформлению автореферата нет.

Заключение

Диссертационная работа Еникеева Аделя Дамирович «Роль белков CRABP и других компонентов сигнального пути ретиноевой кислоты в развитии резистентности опухолевых клеток к ретиноевой кислоте», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 3.1.6. Онкология, лучевая терапия, является самостоятельно выполненным законченным научно-квалификационным трудом, в котором содержится новое решение научной задачи – изучение механизмов резистентности опухолевых клеток к ретиноевой кислоте.

По своей актуальности, объему проведенных исследований, научной новизне и научно-практической значимости полученных автором результатов работа полностью соответствует пп. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 года №842 (в редакции постановления Правительства РФ от 21.04.2016 г. № 335; от 01.10.2018 г. № 1168; от 20.03.2021 г. № 426; от 11.09.2021 г., №1539; от 26.09.2022 г. № 1690; от 26.01.2023 № 101), предъявляемым к

диссертационным работам 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.

Согласен на сбор, обработку, хранение моих персональных данных в диссертационном совете 21.1.032.01, созданном на базе Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, а также принять участие в работе по защите диссертации.

Руководитель лаборатории прогноза
консервативного лечения
МНИОИ им. П.А. Герцена –
филиала ФГБУ «НМИЦ радиологии»
Минздрава России,
д.б.н., профессор,
Контактные данные:
Тел.: +7 (495) 945-74-15 Моб.: +7-903-590-08-95
E-mail: prognos.01@mail.ru
Специальность 14.00.14 – онкология

Н.С.Сергеева

Н.С.Сергеева

Подпись д.б.н., проф. Н.С. Сергеевой «ЗАВЕРЯЮ»

Ученый секретарь
ФГБУ «НМИЦ радиологии»
Минздрава России



Е.П.Жарова

«Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена – филиал Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства Здравоохранения Российской Федерации.

Юридический адрес: 249036, Калужская обл., г.Обнинск, ул. Королева, д.4

Фактический адрес: 125284, г. Москва, 2-ой Боткинский пр., д. 3

Тел: +7(495)945-19-35; e-mail: mnioi@mail.ru

«28» июня 2024г.