

**«УТВЕРЖДАЮ»**

Первый заместитель генерального  
директора

ФГБУ «НМИЦ радиологии»

Минздрава России, доцент, д.м.н.

А.А. Костин

«*В*» *сентября* 2019 г.

## **ОТЗЫВ**

**ведущей организации Московского научно-исследовательского онкологического института имени П.А. Герцена - филиала ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России о научно-практической ценности диссертации Набережного Дениса Сергеевича на тему: «Молекулярные механизмы влияния бластомогенных узкобороздочных лигандов на функционирование систем репарации ДНК», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.01.12 – онкология.**

### **Актуальность темы диссертации**

Диссертация Набережного Дениса Сергеевич посвящена изучению свойств низкомолекулярных соединений, связывающихся посредством нековалентных связей с ДНК – узкобороздочных лигандов. Эти соединения способны изменять как физико-химические характеристики ДНК, так и влиять на геометрические параметры спирали биополимера, ее гибкость и топологию, нарушая функционирование ферментов «домашнего хозяйства» и систем репарации ДНК. В настоящее время в химиотерапии опухолей активно используются ДНК-тропные соединения, обладающие как генотоксическим эффектом, так и способностью дестабилизировать хроматин. В последнее время в связи с активным изучением роли пространственной организации генома в его

функционировании усилился интерес ко второму компоненту действия ДНК-тропных соединений, и, в частности, к механизму действия соединений, не обладающих генотоксическим эффектом. Одним из таких препаратов, показавших свою эффективность в ряде предклинических исследований и клинических испытаний в отношении нейробластом, рака молочной железы, лейкозов, аденокарцином толстой кишки является кураксин CBL0137. В медицинской практике нашли свое применение в качестве противопротозойных препаратов такие узкобороздочные лиганды как диминазен и пентамидин. В тоже время противоопухолевое действие этих соединений и молекулярные механизмы их действия изучены недостаточно. Кроме того, следует отметить, что некоторые ДНК-связывающие соединения обладают бластомогенным действием, молекулярный механизм которого также изучен недостаточно. Все вышесказанное свидетельствует об актуальности изучения молекулярных механизмов действия узкобороздочных лигандов на функционирование генома и, в частности, ферменты репарации ДНК для современной экспериментальной онкологии и молекулярной биологии.

### **Связь темы диссертации с планом научно-исследовательских работ**

Диссертационная работа Набережного Д.С. выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

### **Новизна проведенных исследований и полученных результатов**

Автором был впервые показан рекомбиногенный эффект бластомогенной активности узкобороздочных лигандов Hoechst, исследованы различия в сиквенс-специфичности узкобороздочных лигандов, показана активация белка PARP1 одноцепочечными разрывами *in vitro*, проведен сравнительный анализ способности ряда узкобороздочных лигандов ингибировать белок PARP1.

## **Научно-практическая значимость полученных результатов**

В диссертации оптимизирован метод изучения сиквенс-специфичности ДНК-связывающих соединений – футпринтинг с использованием ДНКазы I путем использования флуорофоров для визуализации фрагментов ДНК; показано, что противопротозойный препарат диминазен может быть рекомендован для клинических испытаний с целью использования в комбинированной химиотерапии опухолей, характеризующихся нарушением системы гомологичной рекомбинации как ингибитор белка PARP1.

## **Общая характеристика диссертационной работы**

Диссертационная работа посвящена исследованию особенностей взаимодействия узкобороздочных лигандов с ДНК и их влияния на гомологичную рекомбинацию и функционирование белка PARP1. Результаты данного исследования важны, с одной стороны, для профилактики бластомогенного эффекта некоторых соединений этого класса, а с другой стороны, для использования этих соединений в качестве модуляторов генотоксического эффекта классических химиопрепаратов. Работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов, обсуждения результатов, заключения и списка литературы. Диссертация изложена на 142 страницах компьютерного текста и состоит из введения, 4 глав, заключения, выводов. Список цитируемой литературы включает 12 отечественных и 283 зарубежных источника. Диссертация иллюстрирована 3 таблицами и 39 рисунками.

Во введении диссертационной работы показана актуальность темы исследования, степень разработанности проблемы, сформулированы цель и задачи исследования, показана научная новизна, научно-теоретическая и практическая значимость исследования. Обзор литературы диссертации состоит из двух частей. Первая часть содержит описание биологических свойств низкомолекулярных ДНК-тропных соединений, таких как ДНК-связывающие

алкилирующие агенты, интеркаляторы и узкобороздочные лиганды. Вторая часть посвящена поли(АДФ-рибоза)-полимеразам, описаны строение и свойства этих белков, а также их ингибиторы. В главе «Материалы и методы» описаны используемые в работе молекулярно-биологические методы, тест на соматические мутации и рекомбинацию (тест SMART), футпринтинг ДНКазой I, двойная репортерная система, иммунохимические методы.

В главе «Результаты» представлены результаты исследования узкобороздочных лигандов. Так описано изучение бластомогенной активности узкобороздочных лигандов Hoechst 33342 и Hoechst 33258 при помощи теста SMART на гетерозиготах *D.melanogaster* wts/TM3 и wts/mus309. Было выявлено, что бластомогенный эффект данных соединений связан с гомологичной рекомбинацией. Далее описано сравнение сиквенс-специфичности ДНК-тропных соединений DAPI, Hoechst 33342 и Hoechst 33258, Pentamidine, Diminazene и Ethidium bromide, CBL0137, DB, DBP и показано, что общим свойством большинства исследованных соединений является связывание с АТ-богатыми участками ДНК, но в тоже время каждый из изученных веществ изменяет по своему профиль расщепления ДНК ДНКазой I. В следующей части главы представлен анализ влияния узкобороздочных лигандов на экспрессию генов. Показано, что двойная репортерная система не позволяет количественно оценить влияние определенного узкобороздочного лиганда на активность транскрипции в зависимости от последовательности нуклеотидов в промоторе гена из-за его влияния на созревание белка. В последней части главы изучена способность ДНК-связывающих соединений ингибировать белок PARP1. Показано, что среди изученных соединений самыми активными ингибиторами PARP1 являются DAPI, Diminazene, Hoechst 33342.

В главе «Обсуждение результатов» данные, полученные в диссертационной работе, сопоставляются с известными литературными данными. Установлено, что ранее известный бластомогенный эффект соединений Hoechst вызван инициацией гомологической рекомбинации ДНК данными соединениями. Показано, что

каждый из узкобороздочных лигандов влияет на фермент ДНКазу I своим определенным образом, при общей тропности к АТ-богатым участкам, как было известно ранее. В следующей части рассмотрены исследования демонстрирующие, что ДНК-связывающие соединения способны ингибировать экспрессию генов, в зависимости от их тропности к той или иной последовательности. Показано, что полученный в диссертации результат влияния узкобороздочных лигандов на экспрессию генов в целом согласуется с известными исследованиями. В заключительной части показано, что  $IC_{50}$  DAPI, Diminazene и Hoechst 33342 имеет тот же порядок, что и  $IC_{50}$  известных ингибиторов белка PARP1, на основании чего сделано заключение о возможности рекомендовать известный противопротозойный препарат Diminazene для клинических испытаний с целью использования в комбинированной химиотерапии опухолей, характеризующихся нарушениями системы гомологичной рекомбинации.

### **Заключение**

Принципиальных замечаний по работе нет. Диссертация написана литературным языком в соответствующем академическом стиле, проиллюстрирована рисунками и таблицами. Содержит достаточное количество ссылок на источники литературы. Компетентность автора и лаборатории в которой проводилось исследование не вызывает сомнений. Выводы, сформулированные в диссертации, следуют из полученных результатов и соответствуют поставленным задачам.

Диссертационная работа Набережного Д.С. на тему «Молекулярные механизмы влияния бластомогенных узкобороздочных лигандов на функционирование систем репарации ДНК» представленная на соискание степени кандидата биологических наук, является законченной самостоятельно выполненной работой, содержащей решение поставленной задачи: анализ взаимодействия узкобороздочных лигандов с ДНК и их влияния на функционирование белков систем репарации ДНК. По объему проведенного

исследования, новизне, научной и практической ценности полученных результатов диссертация соответствует п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года №842 (в редакции постановлений Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 года № 335 и от 02 августа 2016 года №748), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.01.12 онкология.

Отзыв на диссертацию и автореферат обсужден на заседании отделения прогноза эффективности консервативного лечения МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России «17» января 2019 г., протокол №1.

Заведующая отделением прогноза  
эффективности консервативного лечения  
МНИОИ им. П.А. Герцена –  
филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии»  
Минздрава России,  
профессор, д. б. н.



Сергеева Наталья Сергеевна

Подпись профессора, д.б.н. Сергеевой Н.С. «заверяю»:

Ученый секретарь  
МНИОИ им. П.А. Герцена – филиала  
ФГБУ «НМИЦ радиологии»  
Минздрава России



Елена Петровна Жарова

125284, г. Москва, 2-й Боткинский пр., д.3

+7 (495) 150-11-22

[www.mnioi.nmicr.ru](http://www.mnioi.nmicr.ru), [contact@nmicr.ru](mailto:contact@nmicr.ru)

## ОТЗЫВ

Официального оппонента доктора биологических наук, ведущего научного сотрудника лаборатории биологических микрочипов ИМБ РАН Наседкиной Татьяны Васильевны на диссертационную работу Набережного Дениса Сергеевича «Молекулярные механизмы влияния бластомогенных узкобороздочных лигандов на функционирование систем репарации ДНК», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.01.12 – онкология

ДНК является одной из мишеней действия противоопухолевых препаратов. Такие противоопухолевые препараты как цисплатин, доксорубицин, митомицин С, циклофосфамид, топотекан нарушают процессы репликации ДНК, что приводит к подавлению пролиферации активно делящихся опухолевых клеток. Среди потенциальных противоопухолевых веществ узкобороздочные лиганды представляют интерес как соединения, не вызывающие повреждения ДНК, но действующие на процессы репликации, транскрипции и репарации ДНК. В тоже время аффинность узкобороздочных лигандов к ДНК может влиять на действие различных канцерогенов, таких как полициклические соединения, афлатоксины, канцерогенность которых обусловлена образованием ДНК-аддуктов. Для узкобороздочных лигандов, как и вообще для соединений, связывающихся с ДНК нековалентно, канцерогенность к настоящему времени не была выявлена, тем не менее, для ряда узкобороздочных лигандов (серия флуоресцентных красителей Hoechst) был показан бластомогенный эффект в тесте на дрозофиле, однако механизм этого эффекта не изучен. Исходя из вышесказанного, изучение молекулярных механизмов действия узкобороздочных лигандов, обуславливающих их противоопухолевые и канцерогенные свойства, является актуальной задачей современной экспериментальной онкологии, представляющей научный и практический интерес.

Научная новизна диссертационной работы Набережного Д. С. состоит в том, что автором впервые показано, что бластомогенный эффект узкобороздочных лигандов Hoechst обусловлен способностью данных соединений индуцировать гомологичную рекомбинацию; также показаны различия в сиквенс-специфичности связывания с ДНК узкобороздочных лигандов DAPI, Hoechst 33342, Hoechst 33258, Pentamidine, Diminazen, CBL0137. Показано, что узкобороздочные лиганды способны влиять на экспрессию генов в модельной бактериальной системе; изучена способность узкобороздочных лигандов ингибировать белок PARP1, исследована ингибирующая способность некоторых узкобороздочных лигандов (DAPI, Diminazene) в сравнении с одним из известных ингибиторов PARP1, применяемым при лечении ишемии миокарда.

Научная значимость исследования Набережного Д.С. обусловлена тем, что впервые установлен рекомбиногенный механизм индукции соматических активно пролиферирующих клонов (бластомогенный эффект) узкобороздочными лигандами Hoechst. Получены результаты, демонстрирующие роль одноцепочечных разрывов в активации белка PARP1, показано, что при наличии одноцепочечных разрывов в ДНК активация белка PARP1 происходит более эффективно. Практической значимостью диссертационной работы Набережного Д. С. обладают результаты по использованию флуоресцентной метки для проведения футпринтинга ДНК, показывающие, что такая модификация метода обладает достаточной чувствительностью для выявления взаимодействий ДНК-связывающихся соединений с ДНК. Кроме того, в исследовании Набережного Д.С. продемонстрировано, что в исследованном ряду узкобороздочных лигандов можно выделить соединения с достаточно выраженной ингибирующей активностью по отношению к белку PARP1. В частности, к таким соединениям относится антисептический препарат Diminazene, что позволяет рассматривать его в качестве потенциального агента для использования в комбинированной химиотерапии опухолей.



Диссертационная работа Д.С. Набережнова выполнена на высоком профессиональном уровне, достоверность полученных результатов не вызывает сомнений. Диссертация оформлена в традиционной форме: состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов, обсуждения результатов, заключения и литературы. Диссертация изложена на 142 страницах, содержит 39 рисунков и 294 источника литературы из которых 12 отечественных и 283 зарубежных.

Во введении автор показывает актуальность темы диссертационной работы, формулирует цели и задачи исследования, положения, выносимые на защиту, обосновывает новизну и научно-практическую значимость полученных результатов, приводит данные об апробации исследования.

В главе «Литературный обзор» описаны физико-химические, биологические и противоопухолевые свойства ДНК-связывающих соединений (алкилирующих агентов, узкобороздочных лигандов, интеркаляторов). Описаны свойства узкобороздочных лигандов, показано их значение для медицины. Другая часть литературного обзора посвящена белку PARP1. Описаны его строение, функции, значение для онкологии.

Глава «Материалы и методы» содержит подробное описание методик, использованных в диссертационной работе, описаны методы работы с дрозофилой, электрофоретические методы работы, методы работы с бактериями и иммунохимические методы. Автор также приводит описание методов статистической обработки полученных результатов.

Глава «Результаты» содержит описание полученных в диссертационной работе результатов. Описано тестирование Hoechst 33342 и Hoechst 33258 на соматический мутагенез и рекомбинацию в тесте на дрозофиле с использованием современных генетических конструкций и разных линий *Drosophila melanogaster*, несущих мутации в гене супрессоре Warts, и хеликазе Bloom. Далее автор приводит детальное описание экспериментов по анализу сиквенс-специфичности различных узкобороздочных лигандов с помощью футпринтинга ДНК с

использованием ДНКазы I, также исследована их способность влиять на работу бактериальной РНК-полимеразы. В последней части исследования изучена способность узкобороздочных лигандов ингибировать функционирование белка PARP1.

В главе «Обсуждение результатов» проведен анализ соответствия полученных результатов данным опубликованных исследований других авторов, на основании чего сделаны заключения о результатах экспериментов, их достоверности и научной значимости. Автор обсуждает опубликованные ранее данные о бластомогенном эффекте узкобороздочных лигандов Hoechst 33342 и Hoechst 33258, генетические особенности используемых линий дрозофилы, позволившие разделить мутагенный и рекомбиногенный эффекты анализируемых соединений, на основании чего делает вывод о том, что механизм бластомогенного эффекта Hoechst 33342 и Hoechst 33258 связан с индукцией гомологичной рекомбинации и наблюдаемой при этом потерей гетерозиготности. Далее автор рассматривает различное влияние DAPI, Hoechst 33342, Hoechst 33258, Pentamidine и Diminazen, которые при этом являются АТ-специфичными, на активность ДНКазы I. Также рассмотрено влияние узкобороздочных лигандов на экспрессию белков в модельной бактериальной системе. Проанализированы возможные механизмы ингибирования белка PARP1 с помощью узкобороздочных лигандов, проведено сравнение лигандов по их способности ингибировать PARP1 на основании оценки концентрации полумаксимального ингибирования  $IC_{50}$ . Рассмотрен вопрос о том, что препарат Diminazen может быть перспективен для использования в комбинированной противоопухолевой химиотерапии. В заключении диссертационной работы представлены выводы.

### **Заключение**

Диссертационная работа Дениса Сергеевича Набережного «Молекулярные механизмы влияния бластомогенных узкобороздочных лигандов на функционирование систем репарации ДНК», выполненная под руководством доктора медицинских наук Марианны Геннадиевны Якубовской, содержит

решение актуальной задачи – выявление особенностей взаимодействия blastomergenных узкобороздочных лигандов с ДНК и их влияния на функционирование белков систем репарации ДНК. Диссертация является законченной научно-квалификационной работой и по новизне, научной и практической ценности полученных результатов соответствует п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года №842 (в редакции постановлений Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 года № 335 и от 02 августа 2016 года №748), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.01.12 онкология.

Ведущий научный сотрудник  
лаборатории биологических микрочипов  
Федерального государственного бюджетного учреждения науки  
Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта  
Российской академии наук,

доктор биологических наук

Наседкина Татьяна Васильевна

Подпись заверяю:

21.01.2019

Ученый секретарь

Федерального государственного бюджетного учреждения науки  
Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта  
Российской академии наук,  
кандидат ветеринарных наук



Бочаров Александр Анатольевич

Адрес: 119991, г. Москва, ул. Вавилова, д. 32

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта

Российской академии наук, тел. 8(499) 135 98 46

e-mail: nased@biochip.ru

## ОТЗЫВ

Официального оппонента, доктора биологических наук, заведующего лабораторией регуляции экспрессии генов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института цитологии Российской академии наук РАН Барлева Николая Анатольевича на диссертационную работу Набережнова Дениса Сергеевича «Молекулярные механизмы влияния бластомогенных узкобороздочных лигандов на функционирование систем репарации ДНК», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.01.12 – онкология.

### Актуальность

Узкобороздочные лиганды – низкомолекулярные соединения, связывающиеся с малой бороздкой ДНК, получили к настоящему времени широкое распространение в лабораторной практике и экспериментальных исследованиях в качестве флуоресцентных красителей ДНК. Кроме того, ряд соединений этого класса используется в практической медицине в качестве антибактериальных и антисептических препаратов (нетропсин, пентамидин, диминазен). Интерес к узкобороздочным лигандам экспериментаторов-онкологов связан с их способностью взаимодействовать с ДНК, что может приводить к изменению функционирования транскрипционных факторов, ферментов биосинтеза ДНК и РНК, а также систем репарации ДНК. Потенциальная способность таких ДНК-связывающих соединений модулировать активность генотоксичных противоопухолевых препаратов раскрывает новые возможности повышения эффективности комбинированной химиотерапии. В то же время, несмотря на отсутствие генотоксического эффекта, некоторые соединения этого класса проявили бластомогенный эффект в тесте на соматический мутагенез и рекомбинацию на *D.Melanogaster*. Изучение молекулярного механизма данного эффекта важно в плане оценки канцерогенной опасности, связанной с использованием данных соединений. Собственная канцерогенная активность узкобороздочных лигандов на данный момент продемонстрирована не была, однако молекулярные механизмы их бластомогенного действия очевидно

возможности метода и делает его более безопасным для экспериментаторов. Кроме того, как отмечалось выше, практически значимым результатом исследования являются данные об ингибировании PARP1 препаратом диминазен, который в настоящее время используется в медицинской практике в качестве антисептика. Это раскрывает новые возможности по перепрофилированию области применения данного препарата.

### **Содержание и завершенность работы**

Диссертационная работа построена по стандартному плану, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов, обсуждения результатов, заключения и списка литературы. Диссертация изложена на 142 страницах, содержит 39 рисунков и 294 источника литературы.

Во введении автор раскрывает актуальность темы исследования, степень разработанности темы, научную новизну, научно-практическую значимость исследования, формулирует цели и задачи исследования.

Литературный обзор диссертационной работы посвящен описанию и обсуждению опубликованных данных по свойствам ДНК-связывающих низкомолекулярных соединений. Описаны интеркалирующие соединения, алкилирующие агенты и узкобороздочные лиганды. Рассмотрены их физико-химические свойства, биологические и противоопухолевые свойства. Особое внимание уделено механизмам действия препаратов – ДНК-связывающих соединений. В литературном обзоре также приведены современные данные исследований белка PARP1, одного из ключевых компонентов системы репарации ДНК. Описана доменная организация белка, функции в клетке и значение для противоопухолевой терапии.

Глава «Материалы и методы» содержит описание методик и использованных материалов. Автор приводит детальное описание использованных молекулярно-биологических методов, включая методы выделения, визуализации и разделения фрагментов ДНК, и иммунохимические методы, а также методы работы с дрозофилой и бактериями.

В главах «Результаты» и «Обсуждение результатов» проведен критический

заслуживают дальнейшего изучения, поскольку они могут усиливать действие известных канцерогенов.

Таким образом, перспективным направлением современной экспериментальной онкологии является изучение молекулярных механизмов взаимодействия узкобороздочных лигандов с ДНК и их влияния на функционирование ферментов репарации ДНК, вследствие чего тема данной работы является актуальной.

#### **Обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций.**

Диссертационная работа выполнена на высоком методическом уровне, с применением современных молекулярно-биологических методов. Текст диссертации написан понятным языком, результаты работы представлены в логичной форме. Полученный материал является достаточным для формулирования представленных выводов.

#### **Научная и практическая значимость работы**

В диссертационной работе впервые показано, что бластомогенная активность узкобороздочных лигандов обусловлена потерей гетерозиготности в процессе гомологичной рекомбинации. Методом футпринтинга ДНК и с помощью использования двойной репортерной системы было продемонстрировано, что исследованные ДНК-связывающие соединения по-разному влияют на функционирование ДНК-зависимых ферментов, что определяется консенсусной последовательностью нуклеотидов, распознаваемой ферментом. Диссертантом было исследовано влияние узкобороздочных лигандов на активацию белка PARP1 за счет одноцепочечных разрывов ДНК, что является известным стимулятором реакции PARP1-опосредованного поли-АДФ-рибозилирования. Оказалось, что узкобороздочные лиганды ингибируют PARP1-опосредованного поли-АДФ-рибозилирования. Данный результат может иметь важное значение не только в теоретическом, но и прикладном смысле.

Практическая значимость работы заключается в том, что впервые при проведении футпринтинга ДНК с использованием ДНКазы I использована визуализация фрагментов ДНК с помощью флуорофоров, что расширяет

анализ полученных данных, показано их соответствие опубликованным литературным данным, раскрыта их научная новизна и научно-практическая ценность. Описаны особенности исследования бластомогенного эффекта узкобороздочных лигандов с помощью окрашивания красителями Hoechst 33258 и Hoechst 33342 с использованием варианта теста SMART, что позволяет выявлять вклад мутагенного эффекта и потери гетерозиготности в процессе гомологичной рекомбинации. Было показано, что соединения Hoechst проявляют рекомбиногенный эффект при практически полном отсутствии мутагенного эффекта. Сделан вывод, что бластомогенный эффект соединений Hoechst обусловлен рекомбиногенной активностью узкобороздочных лигандов. Следующая часть работы посвящена изучению с помощью футпринтинга ДНК сиквенс-специфичности узкобороздочных лигандов, их повышенной аффинности к определенной последовательности нуклеотидов. Показано, что каждое из соединений DAPI, Diminazen, Pentamidin, Hoechst 33342 и Hoechst 33258, серия DB и серия DBP и CBL0137, по-разному влияют на профиль фрагментов ДНК, получаемый при обработке одной и той же последовательности ДНК ферментом ДНКазы I. Для некоторых из данных соединений сиквенс-специфичность до проведения нашего исследования не изучалась (серия DB и серия DBP и CBL0137), а для остальных в литературе описано их сродство к AT-богатым участкам, но не показаны различия в их сиквенс-специфичности. Следующая часть также посвящена изучению сиквенс-специфичности узкобороздочных лигандов. Для этого была использована система *in vivo*, представляющая собой набор штаммов *E.coli*, которые несут различные плазмиды, содержащие два репортерных гена флуоресцентных белков (Cerulean и RFP). Благодаря тому, что последовательность промотора гена RFP постоянна, а последовательность промотора гена Cerulean переменна, автор смог оценить влияние узкобороздочных лигандов на соотношение уровней содержания флуоресцентных белков в зависимости от последовательности нуклеотидов в промоторе гена Cerulean. Таким образом, Набережнов Д.С. продемонстрировал, что узкобороздочные лиганды оказывают влияние на экспрессию генов в

зависимости от последовательности ДНК промотора. Последняя часть посвящена изучению способности узкобороздочных лигандов ингибировать белок PARP1. Набережнов Д.С. показал, что наиболее перспективным ингибитором PARP1 среди изученных узкобороздочных лигандов является диминазен, что позволяет рекомендовать использование данного соединения в клинических испытаниях в качестве ингибитора PARP1 при комбинированной химиотерапии.

### **Замечания**

1. Кураксин взаимодействует как с узкой бороздкой ДНК, так и интеркалирует в спираль биополимера. Этот факт, с моей точки зрения, необходимо особо подчеркивать при обсуждении эффектов данного соединения.
2. В тексте диссертации встречаются отдельные терминологические неточности, в частности, Вестерн-блоттинг является иммунохимическим методом анализа, а не иммуногистохимическим.
3. В оформлении ссылок 134, 145, 121, 275, 257 допущены неточности.
4. Подписи к рисункам 19, 23, 31 – 35 требуют некоторой стилистической правки.

Вышеуказанные замечания носят рекомендательный характер и не снижают ценности работы, а также не влияют на общую положительную оценку диссертационного исследования.

### **Заключение**

Таким образом, диссертационная работа Д.С. Набережнова «Молекулярные механизмы влияния blastomycenных узкобороздочных лигандов на функционирование систем репарации ДНК» является законченной научно-квалификационной работой, выполненной под руководством доктора медицинских наук Марианны Геннадиевны Якубовской, содержащей новое решение актуальной научной задачи – анализа взаимодействия blastomycenных узкобороздочных лигандов с ДНК и их влияния на функционирование белков

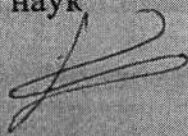


систем репарации ДНК. По новизне, научной и практической ценности полученных результатов диссертация соответствует п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года №842 (в редакции постановлений Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 года № 335 и от 02 августа 2016 года №748), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.01.12 онкология.

Официальный оппонент

Заведующий лабораторией регуляции экспрессии генов  
Федерального государственного бюджетного учреждения науки  
Института цитологии Российской академии наук  
Доктор биологических наук

Профессор РАН



Барлев Николай Анатольевич

Подпись д.б.н. Барлева Н.А. «заверяю»

Ученый секретарь  
Федерального государственного бюджетного учреждения науки  
Института цитологии Российской академии наук  
кандидат биологических наук



Тюряева Ирина Ивановна

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт цитологии Российской академии наук,  
Санкт-Петербург, Тихорецкий проспект 4, 194064,  
Электронная почта: [nick.a.barlev@gmail.com](mailto:nick.a.barlev@gmail.com)  
Тел: +7(812)297-18-29

## ОТЗЫВ

Беляковой Анны Александровны, кандидата медицинских наук,  
врача КЛД ОПЦР ЛМД «ИНВИТРО-МСК» ТД,  
на автореферат диссертации Набережного Дениса Сергеевича на тему:  
«Молекулярные механизмы влияния бластомогенных узкобороздочных лигандов  
на функционирование систем репарации ДНК»,  
представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по  
специальности 14.01.12 – онкология.

Диссертация Набережного Дениса Сергеевича посвящена решению актуальной для онкологии задачи – исследованию свойств узкобороздочных лигандов. Для онкологии узкобороздочные лиганды представляют интерес как в плане совершенствования комбинированной химиотерапии онкологических заболеваний (препараты CBL0137, диминазен), так и в плане развития первичной профилактики рака (бластомогенные соединения Hoechst).

Автореферат содержит общую характеристику диссертационной работы, описание полученных результатов, заключение, содержащее выводы по работе, и список публикаций по теме исследования. Автореферат диссертации полностью соответствует тексту диссертационной работы Набережного Д.С.

Диссертационная работа Набережного Д.С. выполнена на высоком профессиональном уровне с применением современных молекулярно-биологических методов. В результате проведенных исследований в диссертации получен ряд важных для экспериментальной онкологии результатов. Показано, что механизм бластомогенного действия Hoechst связан с рекомбиногенной активностью этих соединений. Продемонстрировано, что каждый из проанализированных узкобороздочных лигандов специфически изменяет профиль расщепления ДНК эндонуклеазой ДНКазы I, но в то же время общим свойством изученных УБЛ, за исключением CBL0137, является взаимодействие с АТ-богатыми последовательностями. Решена важная методическая задача –

оптимизирован метод футпринтинга с использованием флуорофоров. Показано, что узкобороздочные лиганды могут влиять на экспрессию генов в зависимости от последовательности промотора. Предложено использовать препарат Diminazene в комбинации с генотоксическими агентами для опухолей, имеющих нарушение системы гомологической репарации.

Диссертационная работа Набережного Д.С. на тему «Молекулярные механизмы влияния бластомогенных узкобороздочных лигандов на функционирование систем репарации ДНК», представленная на соискание степени кандидата биологических наук, соответствует п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года №842 (в редакции постановлений Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 года № 335 и от 02 августа 2016 года №748), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.01.12 онкология.

Кандидат медицинских наук,  
Врач КЛД ОПЦР ЛМД КДЛ  
«ИНВИТРО-МСК» ТД,  
Беякова А.А.

*А.А. Беякова*  
18.01.2019

125047, г. Москва, улица Тверская-Ямская 4-Я,  
дом 16, корпус 3.  
8(495)363-03-63. [www.invitro.ru](http://www.invitro.ru)

Подпись Беяковой А.А. заверяю.

Заведующий лабораторией молекулярной диагностики  
клинико-диагностической лаборатории  
«ИНВИТРО-Москва»,  
Технологического департамента,  
Гасилова Н.А.



*Н.А. Гасилова*  
18.01.2019