

ОТЗЫВ

официального оппонента, член-корреспондента РАН, доктора биологических наук, профессора Чердынцевой Надежды Викторовны на диссертационную работу Кирсанова Кирилла Игоревича «Узкобороздочные лиганды в канцерогенезе и противоопухолевой терапии», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 14.01.12 – онкология

Актуальность темы

Таргетная или цитотоксическая химиотерапия является одним из основных компонентов терапии большинства онкологических заболеваний. Действие таргетных химиотерапевтических препаратов направлено на специфические молекулярные мишени опухолевой клетки. Эти агенты эффективны лишь для небольшой части онкологических пациентов, в клетках опухолей которых имеются соответствующие генетические аберрации. Генотоксические химиопрепараты первого поколения действуют на все быстро делящиеся клетки, в результате чего происходит гибель как опухолевых, так и нормальных клеток активно пролиферирующих тканей. Это обуславливает развитие побочных эффектов, а также в процессе клональной эволюции опухоли может приводить к генетической нестабильности, высокой мутационной изменчивости опухолевых клеток и отбору резистентных к терапии клонов. Развитие резистентности к применяемым препаратам является одной из наиболее серьезных проблем современной химиотерапии.

Необходимость преодоления побочных эффектов при применении препаратов привела к развитию такой модальности комбинированной химиотерапии, при которой помимо основного терапевтического средства используются адьювантные агенты, позволяющие увеличить терапевтический интервал для основного препарата, избирательно усилить его действие на опухоль.

Новым и актуальным направлением усовершенствования комбинированной химиотерапии является использование малых ДНК-тропных молекул, взаимодействующих с ДНК не ковалентно, а за счет образования водородных и ван-дер-ваальсовых связей. Такие соединения способны нарушать параметры дуплекса ДНК и влиять на его гибкость, что приводит к модулированию активности большого числа ферментов метаболизма ДНК. Существенно, что некоторые из этих веществ обладают высоким противоопухолевым цитостатическим потенциалом, благодаря их способности ингибировать активность топоизомераз, протеинкиназ, серин-треониновых киназ. Другие соединения демонстрируют антиканцерогенную активность и способны предотвращать развитие опухолей в эксперименте *in vivo*. Очевидно, что малые ДНК-тропные молекулы обладают широким спектром биологических активностей, однако данные об этих эффектах весьма разрозненны и фрагментарны. Ранее не проводилось анализа влияния малых ДНК-тропных молекул на хроматин, не исследовались механизмы влияния на белки активации репарации, комплексно не анализировались их потенциальная канцерогенная опасность, не изучались механизмы антиканцерогенной активности.

Таким образом, изучение молекулярных механизмов действия малых ДНК-тропных молекул представляется актуальным как в целях повышения результативности химиотерапевтического лечения злокачественных новообразований, так и для профилактики канцерогенеза.

Содержание и завершенность работы

Диссертационная работа изложена на 266 листах машинописного текста, состоит из введения, 7 глав, заключения, выводов, списка литературы, списка сокращений и 8 приложений. Список литературы включает 275 источников, из которых 18 — отечественные и 257 — зарубежные. Текст иллюстрирован 40 таблицами и 81 рисунком.

Во «Введении» подробно представлены все требуемые позиции: обоснована актуальность исследований, призванных решить имеющиеся в этой

области проблемы, сформулированы цель и задачи исследования, объективно оценены его научная новизна и практическая значимость.

Следует отметить некоторые особенности структуры представления материалов и их распределения по главам, согласно предложенной автором методологии, что не противоречит общепринятым требованиям и адекватно отражает полученные данные. Каждая из глав 1-6 содержит обзор литературы, описание результатов собственных исследований, обсуждение полученных результатов и сравнение их с данными мировой литературы.

Глава 1 посвящена исследованию механизмов взаимодействия узкобороздочных лигандов с ДНК и их влияния на структуру хроматина. В обзоре литературы дается характеристика соединений, осуществляющих нековалентное связывание с ДНК, и их применение в противоопухолевой терапии. В частности, приводятся их структуры, история открытия, описываются механизмы действия и результаты доклинических и клинических исследований препаратов этого класса. В главе 1 приводятся оригинальные результаты собственных исследований сиквенс-специфичности узкобороздочных лигандов (УБЛ), их способности ингибировать топоизомеразу I, влияния УБЛ на структуру хроматина и на локализацию субъединиц SSRP1 и SPT16 гистонового шаперона FACT в ядре. Автору удалось показать, что помимо общей АТ-специфичности, каждая из молекул имеет свой профиль взаимодействия с ДНК, для Кураксина были выявлены определенные сиквенсы ДНК, к которым этот агент наиболее тропен. Также было установлено, что узкобороздочные лиганды влияют на структуру и процессы компактизации хроматина, вызывая исключение линкерного гистона H1 из хроматина и релокализацию гистонового шаперона FACT.

В главе 2 автор описывает влияние УБЛ на полиг(АДФ-рибоза)-полимеразу I (PARP 1), вовлеченнную в процессы reparациии при химиотерапии. Обзор литературы этой главы посвящен семейству белков PARP: их строению, свойствам и роли в процессах жизнедеятельности. В разделе собственных результатов описаны эксперименты по изучению влияния УБЛ на активность

белка PARP1 *in vivo* и *in vitro*. Такие исследования проводились впервые. В ходе работы удалось установить и продемонстрировать, что АТ-специфические ДНК-тропные соединения способны ингибировать *in vitro* и *in vivo* ДНК-зависимую активацию фактора репарации PARP1 путем разобщения связи фермента с ДНК-активатором по конкурентному механизму. Также было показано, что при действии некоторых ДНК-тропных агентов происходит исключение PARP1 из зон конденсированного гетерохроматина, что приводит к реактивации экспрессии молчащих ретротраспозонов, индуцирующих проапоптотическую и антиплиферативную активность.

Глава 3 посвящена изучению влияния УБЛ на эпигенетическую регуляцию экспрессии генов. Обзор литературы данной главы включает в себя описание механизмов эпигенетической регуляции экспрессии генов. Первая часть с результатами собственных исследований включает описание экспериментов по разработке и валидации тест-системы для анализа эпигенетической активности ксенобиотиков. Вторая часть посвящена механизмам эпигенетического действия УБЛ. Было показано, что популяция клеток HeLa, несущая ретровирусный вектор с эпигенетически репрессированным репортерным геном зеленого флуоресцентного белка GFP, является адекватной тест-системой для скрининга химических соединений на способность реактивировать экспрессию генов. При исследовании УБЛ было продемонстрировано, что большинство из них оказывают существенное влияние на профиль метилирования ДНК и модификации гистонов, таким образом модулируя активность причинно значимых в плане канцерогенеза генов.

В главе 4 автор касается аспектов канцерогенной безопасности малых ДНК-тропных молекул. В обзоре литературы приводятся современные данные о типах и механизмах нарушения ДНК, а также подробно описывается стратегия тестирования ксенобиотиков на их канцерогенную опасность в краткосрочных тестах. Описание собственных результатов включает анализ данных по мутагенной, рекомбиногенной и бластомогенной активности УБЛ. Впервые удалось продемонстрировать, что, не проявляя мутагенной активности,

некоторые малые ДНК-тропные молекулы способны оказывать рекомбиногенное действие.

Глава 5 посвящена изучению антиканцерогенных свойств Кураксина CBL0137. В рамках диссертационного исследования в среднесрочном эксперименте *in vivo* было установлено, что этот агент обладает сильными антиканцерогенными свойствами и снижает более чем в 2 раза частоту появления ряда опухолей при их индукции канцерогеном ДМГ. Было продемонстрировано, что это обуславливается противовоспалительным действием Кураксина и его способностью ингибировать сигнальный путь WNT.

В главе 6 описываются эксперименты по изучению противоопухолевой активности узкобороздочных лигандов. В работе впервые *in vitro* и *in vivo* показана способность димиазена увеличивать чувствительность опухолевых клеток к действию ряда генотоксических и таргетных препаратов. Кроме того, была установлена противоопухолевая активность димиазена в отношении сарком матки и лимфом, а кураксина - в отношении опухолей толстой кишки и сарком матки.

В главе 7 представлены объекты исследования, методологические и методические подходы при осуществлении исследования. Она содержит описание материалов и методов, использованных при экспериментальной работе. В качестве методологической основы исследования были использованы комплексный и системный подходы с применением современных физико-химических и молекулярно-биологических методов исследования, а также моделирования процессов опухолевого роста *in vivo*.

Заключение и выводы логично вытекают из содержания диссертации, основаны на полученных результатах и полностью соответствуют цели и задачам исследования.

Автореферат по содержанию полностью соответствует диссертации.

Таким образом, в ходе работы автором получены данные, позволяющие рассматривать малые ДНК-тропные соединения в качестве перспективных модуляторов действия противоопухолевых препаратов с целью повышения

эффективности противоопухолевой терапии и агентов, способных модифицировать действие канцерогенов, с целью профилактики канцерогенеза.

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

Обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертационной работе Кирсанова К.И., обусловлена актуальностью проводимых исследований, корректно сформулированной целью работы и постановкой адекватных задач, которые должны быть решены для ее достижения. Научные положения и выводы обеспечены достаточным объемом исследований, обширной методической базой, включающей в себя молекулярно-генетические, электрофоретические и иммунохимические исследования, использование широкого спектра моделей *in vitro* и *in vivo*, и позволяющей получать достоверные результаты, а также применением современных статистических прикладных программ для корректной обработки данных. Полученный материал является достаточным для формулирования представленных выводов и выносимых на защиту положений.

Достоверность и новизна научных положений, выводов и рекомендаций

Главной целью работы явилось научное обоснование противоопухолевой и антиканцерогенной активности ДНК-тропных малых молекул, нековалентно взаимодействующих с узкой бороздкой ДНК, и изучение молекулярных механизмов их действия. В работе показано влияние таких соединений на эпигенетическую регуляцию транскрипции, связанную с модификацией гистонов и метилированием ДНК, а также обеспечение ими условий для повышения чувствительности опухолей к химиотерапевтическим препаратам. Новизна работы обусловлена получением новых данных об эффектах специфических ДНК-тропных соединений, взаимодействующих с ДНК узкой бороздки, в отношении ингибирования активности ферментов reparации,

влияющих на проявление цитостатической активности химиопрепаратов, возможности реактивации генов на уровне эпигенетической регуляции. Автором впервые обозначены ДНК-тропные соединения, обладающие противоопухолевой активностью и способностью ингибировать канцерогенез. Выявлены соединения, способные повышать эффективность таргетных и конвенциональных препаратов за счет повышения чувствительности опухолевых клеток к цитостатикам. Практическая значимость работы заключается в перспективе разработки методов комбинированной химиотерапии с использованием ДНК-тропных малых молекул для повышения результативности лечения. Получены оригинальные данные о способности изучаемых соединений ингибировать фермент репарации PARP, что открывает путь к разработке нового класса его ингибиторов. Кроме того, на основе полученных данных могут быть разработаны методы для экспресс оценки эпигенетической активности соединений.

Положения, выносимые на защиту, являются квинтэссенцией полученных результатов, обоснованы и подтверждены многочисленными таблицами и рисунками, отражают ключевые научные достижения работы фундаментального и прикладного характера.

Таким образом, работа, посвященная изучению молекулярных механизмов действия узкобороздочных лигандов, представляется актуальной как в плане совершенствования химиотерапии онкологических пациентов, так и в аспекте профилактики формирования злокачественных новообразований, выполнена в соответствии со стандартами молекулярно-биологических исследований. Широкий спектр современных высокотехнологичных методов использован в работе для решения поставленных задач. Новые данные, полученные автором, согласуются с имеющимися в российской и зарубежной литературе отдельными данными по исследованию свойств малых ДНК-тропных соединений. Автором проведен достаточно полный и аргументированный анализ полученных данных с использованием сведений по этому вопросу в мировой литературе. Достоверность полученных данных обуславливается адекватным выбором

материала и экспериментальных моделей, современных технологий исследования и корректным использованием методов математического анализа.

Диссертация написана хорошим литературным языком, иллюстрирована большим количеством таблиц и рисунков. Результаты исследований представлены в 24 публикациях, в том числе в высоко импактных зарубежных журналах, обсуждены на представительных международных конференциях. Принципиальных замечаний по работе нет. Хотелось бы задать вопрос по сути проведенного исследования.

Вопрос

На основании полученных Вами данных поясните, пожалуйста, какие из изученных ДНК-тропных молекул являются перспективными для повышения эффективности таргетных или конвенциональных химиопрепаратов.

Заключение

Таким образом, диссертационная работа Кирсанова Кирилла Игоревича «Узкобородочные лиганда в канцерогенезе и противоопухолевой терапии» является законченным научным трудом, в котором получена совокупность фундаментальных данных о механизмах противоопухолевого и антиканцерогенного действия малых ДНК-тропных молекул, их способности повышать эффективность химиотерапии, что открывает новое направление разработки противоопухолевых агентов и модификаторов химиотерапии на основе направленной коррекции экспрессии и активности ферментов метаболизма ДНК опухолевой клетки с помощью узкобородочных лигандов.

В целом, по своей актуальности, научной новизне и практической значимости результатов, полученных на современном методологическом уровне, диссертационная работа Кирсанова К.И. соответствует 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 заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 14.01.12 – онкология.

Даю свое согласие на сбор, обработку, хранение и передачу персональных данных в диссертационный совет Д 001.017.01 на базе ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Официальный оппонент

Доктор биологических наук (14.03.03 – патологическая физиология),
профессор (14.01.12 – онкология)
член-корреспондент РАН, заведующая лабораторией
молекулярной онкологии и иммунологии,
заместитель директора по научной работе
научно-исследовательского института онкологии
федерального государственного бюджетного
научного учреждения «Томский национальный
исследовательский медицинский центр
Российской академии наук»

Чердынцева

Чердынцева Надежда Викторовна

Подпись член-корреспондента РАН,
профессора Чердынцевой Н.В. заверяю

Ученый секретарь
федерального государственного
бюджетного научного учреждения
«Томский национальный исследовательский
медицинский центр Российской академии наук»
кандидат биологических наук



Хитринская

Хитринская Ирина Юрьевна

13.05.2020

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук»

634009, г. Томск, пер. Кооперативный, дом 5,
тел.: 8(3822)51-33-06;
e-mail: center@tnimc.ru;
сайт: www.tnimc.ru