

«УТВЕРЖДАЮ»

Первый заместитель

генерального директора

ФГБУ «НМИЦ радиологии»

Минздрава России

Член-корр. РАН, доцент, д.м.н.

А.А. Костин

«13» мая 2020 г.



### ОТЗЫВ

**Ведущей организации московского научно-исследовательского онкологического института им. П.А.Герцена – филиала федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации о научно-практической ценности диссертации 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 диссертации

Химиотерапия злокачественных новообразований на сегодняшний момент является одним из основных компонентов лечения больных с онкологическими заболеваниями. Несмотря на достижения в области разработки и создания таргетных препаратов, их эффективность носит ограниченный характер и показана лишь для некоторых типов опухолей. В связи с этим, основным видом химиопрепаратов остаются классические генотоксические агенты, действие которых направлено на повреждение ДНК быстро пролиферирующих клеток. Однако такая химиотерапия способствует мутационной изменчивости и генетической нестабильности как в клетках опухоли, так и нормальных клетках, что может являться причиной возникновения вторично-множественных опухолей, а также, в ряде случаев, увеличения скорости прогрессии опухоли. Таким образом, усовершенствование подходов к химиотерапии и поиск новых



адьювантных препаратов, способных скорректировать действие терапии, являются актуальными направлениями современной онкологии.

Одним из новых направлений развития химиотерапии злокачественных новообразований является использование ДНК-тропных малых молекул, которые не взаимодействуют с ДНК ковалентно, а образуют с макромолекулой водородные, электростатические и ван-дер-ваальсовы связи. За счет влияния на стерические характеристики дуплекса, такие соединения могут влиять на работу ферментов метаболизма ДНК, что приводит к изменению интенсивности таких процессов, как репликация, транскрипция, репарация ДНК и т.д. Отсутствие токсичности в физиологических дозах и мутагенности у этих соединений отличает их как от классических цитостатиков, так и от противоопухолевых таргетных препаратов. Кроме того, для некоторых соединений данной группы в экспериментах *in vivo* и *in vitro* был продемонстрирован антиканцерогенный эффект. Наиболее многочисленной группой таких соединений являются агенты, нековалентно связывающиеся в узкой бороздке ДНК – узкобороздочные лиганды (УБЛ). Имеющиеся данные об эффектах УБЛ позволяют рассматривать их как соединения, потенциально способные обладать широким спектром биологической активности.

Диссертационная работа Кирсанова К.И. посвящена комплексному анализу биологических эффектов и механизмов действия УБЛ с использованием современных молекулярно-биологических методов исследования. Одним из исследуемых аспектов является взаимодействие УБЛ с ДНК и хроматином опухолевой клетки. Сиквенс-специфичность УБЛ, их влияние на уровень компактизации хроматина, гистоны и гистоновые шапероны определяют спектр действия каждого из агентов. Помимо этого, в работе исследуется влияние УБЛ на функционирование систем репарации, нарушение которых непосредственно связано с механизмами канцерогенеза. В рамках работы анализируются механизмы влияния УБЛ на эпигенетическую регуляцию экспрессии генов. Нарушение эпигенетической регуляции является одной из причин резистентности опухоли к химиопрепаратам. Исследование потенциальной канцерогенной



опасности УБЛ в краткосрочных тестах по выявлению рекомбиногенных, мутагенных и бластомогенных свойств является важным аспектом для понимания механизмов действия и определения потенциальных рисков их применения в медицинской практике.

Результаты, полученные в ходе работы, подтверждают гипотезу о возможности использования УБЛ в качестве как адъювантных, так и самостоятельных химиопрепаратов. Очерчен круг соединений, которые способны оказывать рекомбиногенное действие. Выявлены механизмы эпигенетического действия УБЛ. Более того, работа Кирсанова К.И. актуальна не только в плане практического исследования новых препаратов для химиотерапии злокачественных новообразований, она затрагивает важные фундаментальные вопросы, такие, как механизмы влияния малых ДНК-тропных молекул на структуру хроматина, механизмы ингибирования запуска репарации, факторы, лежащие в основе антиканцерогенных эффектов малых ДНК-тропных молекул.

Учитывая все вышесказанное, можно с уверенностью утверждать, что задачи исследования Кирсанова К.И. в области изучения молекулярных механизмов действия УБЛ представляются актуальными как в целях совершенствования химиотерапии злокачественных новообразований, так и для профилактики канцерогенеза.

#### **Связь выполненной работы с планами соответствующих отраслей науки**

Диссертационная работа Кирсанова К.И. «Узкобороздочные лиганды в канцерогенезе и противоопухолевой терапии» выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

#### **Новизна полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации**

В диссертационной работе Кирсанов К.И. продемонстрирован широкий спектр новых биологических активностей малых ДНК-тропных молекул. Впервые было продемонстрировано влияние УБЛ на линкерный гистон H1 и гистоновый шаперон FАСТ, обуславливающие хроматин-дестабилизирующий эффект этой



группы соединений. Впервые было показано, что УБЛ ингибируют активность поли(АДФ-рибозы)-полимеразы *in vitro* и *in vivo* путем разобщения связи PARP1 с ДНК по конкурентному механизму и специфически подавляют только ДНК-зависимую активацию PARP1. Также было показано, что действие УБЛ приводит к накоплению мРНК ретротранспозонов в цитоплазме за счет вытеснения PARP1 из зон конденсированного гетерохроматина. Была впервые разработана тест-система по выявлению эпигенетических эффектов ксенобиотиков на основе клеточной популяции HeLa TI, несущей эпигенетически репрессированный ген зеленого флуоресцентного белка. На этой системе впервые было исследовано влияние УБЛ на процессы метилирования и ацетилирования гистонов, а также метилирования ДНК. Впервые было установлено, что некоторые УБЛ оказывают потенцирующее действие на реактивацию экспрессии генов эпигенетическими ингибиторами ацетилирования гистонов и метилирования ДНК. В рамках изучения потенциальной опасности УБЛ в краткосрочных тестах впервые было показано, что некоторые УБЛ могут оказывать рекомбиногенное действие. Впервые в экспериментах *in vivo* было установлено, что кураксины обладают значительным антиканцерогенным действием в отношении химически-индуцированного рака толстой кишки, показано, что, помимо их способности подавлять воспаление и активировать апоптоз, этот эффект обуславливается их способностью ингибировать активность сигнального пути WNT. Впервые была продемонстрирована способность диминазена сенситизировать опухолевые клетки к действию ряда химиопрепаратов *in vitro* и *in vivo*, впервые была установлена противоопухолевая активность кураксина в отношении опухолей толстой кишки и сарком матки, а диминазена - в отношении лимфом и сарком матки. Полученные данные являются научным обоснованием как для дальнейших фундаментальных исследований влияния малых ДНК-тропных молекул на функционирование генома клетки, так и для усовершенствования химиотерапии.

**Значимость полученных автором диссертации результатов для науки и производства**

При выполнении данного исследования был получен ряд приоритетных



данных.

Было показано, что близкие по химической структуре УБЛ обладают различными эпигенетическими эффектами и специфичны к различным мотивам ДНК. Установлено, что все УБЛ вызывают вытеснение из хроматина линкерного гистона H1 и привлечение гистонового шаперона FACT, что является фактором нарушения компактизации хроматина. Продемонстрирован новый механизм ингибирования белка-индуктора эксцизионной репарации PARP1 узкобороздочными лигандами, который отличается от механизма действия ныне существующих ингибиторов PARP1. Так, показано, что при действии УБЛ происходит разобщение взаимодействия белка с ДНК. Эти данные интересны с точки зрения перспективы использования малых ДНК-тропных молекул в качестве ингибиторов PARP1 в противоопухолевой терапии, как в виде монотерапии, так и в комбинированной терапии с генотоксическими агентами, последнее было подтверждено данными исследований *in vitro* и *in vivo*. Также было показано, что УБЛ обладают эпигенетической активностью и способны потенцировать действие известных ингибиторов гистоновых деацетилаз и метилтрансфераз. Вместе вышеупомянутые данные открывают новое направление поиска факторов повышения эффективности химиотерапии путем направленного модулирования экспрессии генов и активности ферментов метаболизма ДНК опухолевой клетки с помощью УБЛ.

При исследовании потенциальных канцерогенных свойств малых ДНК-тропных молекул впервые было продемонстрировано, что некоторые из этих молекул, не проявляя в краткосрочных тестах мутагенной и цитогенетической активности, способны увеличивать частоту появления клеток с потерей гетерозиготности *in vivo*, выступая в роли рекомбиногенов. Поскольку широко используемые тесты по анализу канцерогенной безопасности новых препаратов способны выявлять лишь события мутагенеза, полученные данные свидетельствуют о необходимости внедрения в повседневный скрининг ксенобиотиков также тестов на рекомбиногенную активность.



В рамках диссертационной работы была разработана тест-система для выявления эпигенетической активности соединений, в основу которой легла поликлональная популяция клеток HeLa T1, которая несет эпигенетически репрессированный репортерный ген зеленого флуоресцентного белка. Было показано, что HeLa T1 может быть использована для скрининга эпигенетической активности ксенобиотиков, в том числе и тех, которые требуют метаболической активации.

Было продемонстрировано, что производное карбазола кураксин обладает антиканцерогенной активностью относительно индуцированного рака толстого кишечника *in vivo*. Установлено, этот эффект обуславливается противовоспалительными свойствами кураксина и его способностью ингибировать сигнальный путь WNT. Сильный эффект по снижению частоты появления индуцированных опухолей толстого кишечника у мышей свидетельствует о перспективности использования препаратов с подобным механизмом действия в профилактике злокачественных новообразований.

Таким образом, представленная диссертационная работа имеет высокую научно-практическую значимость для современной онкологии и открывает новое перспективное научное направление по использованию малых ДНК-тропных молекул в химиотерапии и профилактике онкологических заболеваний.

### **Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы**

Положения, сформулированные в диссертации, относительно молекулярных механизмов действия малых ДНК-тропных молекул, их способности усиливать действие некоторых генотоксических химиопрепаратов, их эпигенетической активности открывают перспективы для доклинического испытания некоторых из соединений. Результаты работы в области рекомбиногенной активности некоторых УБЛ целесообразно использовать на практике при тестировании новых лекарственных средств или других химических агентов. Полученные в работе результаты являются обоснованием усовершенствования и разработки новых



протоколов комбинированной химиотерапии. Результаты исследования и разработанные методические приемы рекомендуется применять в деятельности других научных коллективов при изучении механизмов действия малых ДНК-тропных молекул, в частности, в лабораториях ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России, ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава, Института молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта и некоторых других институтов. Рекомендовано использовать результаты исследования для подготовки учебных курсов кафедр онкологической и молекулярно-биологической специализации в высших учебных заведениях РФ.

### **Заключение**

Диссертационная работа Кирсанова К.И. «Узкобороздочные лиганды в канцерогенезе и противоопухолевой терапии» является законченной научно-квалификационной работой, в которой сформулированы научные и практические положения, совокупность которых может быть квалифицирована как крупное научное достижение в области фундаментальной онкологии. Представленная работа посвящена актуальной теме, представляет большой интерес как в научном плане, так и в практическом здравоохранении, и полностью соответствует всем 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 Кирсанов К.И. заслуживает присуждения искомой степени доктора биологических наук по специальности 14.01.12 – онкология.

Диссертация Кирсанова К.И. «Узкобороздочные лиганды в канцерогенезе и противоопухолевой терапии», обсуждена заседании отделения прогноза эффективности консервативного лечения МНИОИ им. П.А. Герцена – филиала ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России (протокол № 10 от 8 мая 2020 года).

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

Н.С. Сергеева

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

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



Е.П. Жарова

Московский научно-исследовательский онкологический институт имени П.А. Герцена – филиал Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Москва

Адрес: 125284, г. Москва, 2-1 Боткинский пр., д.3

Тел: +7 (495) 945-80-20, e-mail: mnioi@mail.ru