

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора медицинских наук, профессора Бойчука Сергея Васильевича 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

Диссертационная работа Кирсанова К.И. посвящена исследованию молекулярных механизмов действия малых ДНК-тропных молекул. Эти соединения, не взаимодействуя с ДНК ковалентно, способны формировать с макромолекулой электростатические, ван-дер-ваальсовы и водородные связи. Такое взаимодействие не является причиной нарушения последовательности ДНК, не способствует мутагенезу, однако может препятствовать работе большого числа ферментов метаболизма ДНК. Некоторые молекулы этой группы ингибируют работу топоизомераз, другие – способствуют снижению активности транскрипции и репликации за счет их влияния на работу полимераз. Для ряда узкобороздочных лигандов ранее была продемонстрирована способность ингибировать тирозиновые киназы, эндо- и экзонуклеазы, а также разобщать взаимодействие ДНК с факторами транскрипции. Накопленные данные свидетельствуют о том, что малые ДНК-тропные молекулы обладают широким спектром биологических эффектов, которые могут быть использованы для усовершенствования химиотерапевтического лечения онкологических больных. Более того, для некоторых молекул, взаимодействующих с ДНК по узкой бороздке, в частности, некоторых биофлавоноидов, в экспериментах *in vivo* и *in vitro* была показана антиканцерогенная активность, однако, молекулярные механизмы такого действия исследованы недостаточно.

Целью работы Кирсанова К.И. является изучение молекулярных механизмов противоопухолевой и антиканцерогенной активности ДНК-тропных малых молекул, нековалентно взаимодействующих с узкой бороздкой ДНК. В основные

задачи представленного комплексного исследования УБЛ вошло изучение молекулярных механизмов ДНК-опосредованного действия узкобороздочных лигандов, в частности, анализ сиквенс-специфичности и влияния УБЛ на структуру хроматина; исследование механизмов влияния УБЛ на функционирование основного фактора запуска эксцизионной репарации поли-(АДФ-рибозы)-полимеразу I (PARP1); исследование молекулярных механизмов эпигенетических эффектов узкобороздочных лигандов; исследование антиканцерогенных и противоопухолевых свойств УБЛ *in vitro* и *in vivo*; а также изучение канцерогенной безопасности УБЛ путем анализа их мутагенных, рекомбиногенных и бластомогенных свойств. Помимо фундаментальных вопросов о молекулярных механизмах действия малых ДНК-тропных молекул в работе изучается и ряд аспектов практической направленности. В частности, *in vitro* и *in vivo* исследуется возможность использования УБЛ в качестве адьювантных препаратов для увеличения чувствительности опухолевых клеток к действию цитотоксических и некоторых таргетных препаратов, изучается возможность применения УБЛ для профилактики канцерогенеза. Всё вышеупомянутое обуславливает высокую актуальность представленной работы для экспериментальной онкологии.

Содержание и завершенность диссертационного исследования

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» в краткой форме обоснованы актуальность проблемы, сформулированы цель и задачи исследования, представлены научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, а также положения, выносимые на защиту.

Глава 1 посвящена изучению механизмов взаимодействия УБЛ с ДНК и их влияния на структуру хроматина. В частности, описано исследование сиквенс-специфичности УБЛ, способности этих молекул ингибировать топоизомеразу I,

влияния УБЛ на нуклеосому и гистоны, а также влияния УБЛ на локализацию субъединиц гистонового шаперона FACT в ядре.

В главе 2 подробно исследуются эффекты УБЛ в отношении поли(АДФ-рибоза)-полимеразы I (PARP1). Подробно описаны схемы и результаты экспериментов по влиянию УБЛ на активность PARP1 в реконструированных системах *in vitro*, а также на активность и локализацию PARP1 *in vivo* на *Drosophila melanogaster*. Далее демонстрируется способность УБЛ реактивировать экспрессию ретротранспозонов в молчащем гетерохроматине.

Глава 3 посвящена исследованию влияния УБЛ на эпигенетическую регуляцию экспрессии генов. В первой части данной главы приводится анализ системы скрининга химических соединений (клеточная популяция HeLa T1) на способность реактивировать экспрессию генов: исследуется способность клеток HeLa T1 к реактивации репортерного гена GFP в ответ на действие известных эпигенетических агентов; проводится оценка способности ферментативной системы клеток этой популяции метаболизировать проканцерогены. Вторая часть этой главы повествует об эпигенетических эффектах УБЛ на клетках HeLa T1: их влияние на уровень экспрессии GFP, на гистоновые модификации и уровень метилирования ДНК.

В главе 4 описывается исследование безопасности УБЛ, в частности, изучаются их мутагенные, рекомбиногенные и бластомогенные свойства в различных системах *in vitro* и *in vivo*: мутагенная активность анализируется в тесте Эймса на *Salmonella typhimurium*; генотоксические свойства УБЛ исследованы в тесте на индукцию хромосомных aberrаций в клетках костного мозга мышей; мутагенная, бластомогенная и рекомбиногенная активность УБЛ изучена в тесте SMART на *Drosophila melanogaster*. Последняя серия экспериментов в данной главе посвящена изучению природы бластомогенной активности УБЛ и их влиянию на запуск гомологичной рекомбинации.

В главе 5 подробно описано комплексное исследование антиканцерогенных свойств Кураксина CBL0137. В частности, приводятся данные эксперимента по выявлению способности Кураксина ингибировать канцерогенное действие 1,2-

диметилгидразина на клетки кишечника и других органов *in vivo*, а также демонстрируются молекулярные механизмы такого антиканцерогенного действия.

Глава 6 посвящена экспериментам по выявлению противоопухолевых свойств УБЛ. В этой главе описываются эксперименты по влиянию УБЛ на эффективность действия цитостатиков на культурах опухолевых клеток, по изучению комбинированных эффектов УБЛ с ингибитором PARP1, а также по исследованию противоопухолевых свойств малых ДНК-тропных молекул диминазена и Кураксина на нескольких аллографтных моделях *in vivo*.

Глава 7 имеет справочный характер и содержит подробное описание материалов и методов, которые были использованы в работе.

Данные, полученные в ходе работы, обобщены в 10 выводах, непосредственно отражающих результаты работы.

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

Сформулированные автором положения, выносимые на защиту, четко обоснованы в тексте диссертации. В качестве методологической основы исследования автором были использованы комплексный и системный подходы с применением современных физико-химических и молекулярно-биологических методов исследования и использованием модельных систем *in vitro* и *in vivo*. Завершающие диссертационную работу выводы обоснованы фактическим материалом, полученным в результате выполнения представленной работы. Достоверность результатов подтверждена адекватным выбором методов и использованием современных методов математической статистики.

Достоверность и новизна научных положений, выводов и рекомендаций

В представленном исследовании продемонстрирован широкий спектр новых биологических активностей малых ДНК-тропных молекул. В частности, впервые установлено влияние УБЛ на структуру хроматина и функционирование гистонового шаперона FACT. Впервые показано влияние УБЛ на активность поли(АДФ-рибозы)-полимеразы *in vitro* и *in vivo*, продемонстрирован механизм

ингибирования PARP1 узкобороздочными лигандами. Показано, что УБЛ вызывают вытеснение PARP1 из зон конденсированного генерохроматина, что влечет за собой активацию транскрипции молчащих ретроэлементов. Впервые была выявлена рекомбиногенная активность некоторых УБЛ. В рамках работы была впервые разработана тест-система на основе клеточной популяции HeLa T1 для анализа ксенобиотиков на их эпигенетическую активность. Помимо верификации этой тест-системы на известных эпигенетических соединениях впервые была исследована и установлена эпигенетическая активность малых ДНК-тропных молекул, показаны механизмы их действия, выявлено синергическое эпигенетическое действие в комбинации с ингибиторами гистоновых деацетилаз и ДНК-метилтрансфераз. Впервые была продемонстрирована способность кураксина ингибировать химически-индуцированный канцерогенез в толстом кишечнике *in vivo*, а также установлено, что в основе такой антиканцерогенной активности лежит способность кураксина не только оказывать противовоспалительное действие, но и ингибировать активность сигнального пути WNT. В работе впервые *in vitro* и *in vivo* показана способность диминазена увеличивать чувствительность опухолевых клеток к действию некоторых генотоксических и таргетных препаратов. Кроме того, была установлена противоопухолевая активность диминазена в отношении сарком матки и лимфом, а кураксина - в отношении опухолей толстой кишки и сарком матки.

Достоверность полученных результатов обусловлена тем, что представленные в работе теоретические положения, выводы и методологические подходы основаны на глубокой и тщательной проработке полученных в работе данных с применением комплекса современных молекулярно-биологических и статистических методов, адекватных поставленным задачам. Представленных объем экспериментальных наблюдений и качество обработки данных являются достаточными для решения поставленных задач, обеспечивают достоверность результатов исследования и сформулированных выводов.

Вопросы

1. Является ли действие узкобороздочных лигандов специфичным?

2. Как Вы считаете, какое из направлений внедрения малых ДНК-тропных молекул в противоопухолевую терапию (в качестве монопрепаратов либо в комбинации с другими агентами) является наиболее перспективным?

Заключение

В диссертационной работе Кирсанова Кирилла Игоревича «Узкобороздочные лиганды в канцерогенезе и противоопухолевой терапии», представленной на соискание ученой степени доктора биологических наук, выявлен и изучен широкий спектр новых биологических эффектов малых ДНК-тропных молекул, которые могут быть использованы не только как основа для дальнейших фундаментальных исследований, но также для совершенствования протоколов химиотерапии и разработки стратегии профилактики онкологических заболеваний. Совокупность данных теоретических положений можно квалифицировать как новое крупное достижение в развитии онкологии. 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.

Официальный оппонент:

Декан медико-биологического факультета
Федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего образования
«Казанский государственный медицинский университет»
Министерства Здравоохранения Российской Федерации,
заведующий кафедрой общей патологии,
доктор медицинских наук, профессор

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

Бойчук С.В.

Подпись д.м.н., профессора Бойчука С.В. заверяю:

16.06.2020

Ученый секретарь

ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет»

Минздрава России,

д.м.н., профессор



Радченко О.Р.

420012, Приволжский федеральный округ,

г.Казань, ул. Бутлерова, д.49,

тел.: 8 (843) 236-06-52;

e-mail: med-bio@kazanmu.ru;

сайт: <https://kazanmu.ru/>