

ОТЗЫВ

Официального оппонента Татарского Виктора Вячеславовича 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 исследования. Диссертация Аделя Дамировича Еникеева посвящена исследованию механизма действия ретиноевой кислоты (РК) и ее связывающих белков CRABP1 и CRABP2 в раке молочной железы, и роли белков CRABP в устойчивости опухолевых линий рака молочной железы к РК и канцерогенезе рака молочной железы. РК применяется в терапии опухолей крови – острого промиелоцитарного лейкоза и Т-клеточной лимфомы, однако его активность ограничена небольшой эффективностью в других типах опухолей и побочными эффектами. Более четкое понимание механизма действия РК и выявление маркеров резистентности позволит более точно направить потенциальные терапии с применением РК или разработать лекарственные средства, направленные на других участников каскада. Таким образом диссертация Еникеева А.Д. является актуальной как с фундаментальной, так и с прикладной точки зрения.

Структура диссертационной работы. Диссертация изложена на 140 страницах и построена по традиционному принципу, включает в себя разделы «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение», «Выводы» и «Список литературы». Диссертация хорошо иллюстрирована, содержит 30 рисунков и 6 таблиц. Список литературы включает 255 источников, включая самые современные публикации.

Характеристика диссертации.

В разделе «Обзор литературы» подробно освещаются механизм клеточного канонического и неканонического сигналинга ретиноевой кислоты и белки, связывающие ретиноевую кислоту. Затем более подробно рассматриваются белки CRABP1 и CRABP2 и их роль в канцерогенезе. Во второй части литературного обзора подробно рассматриваются механизмы резистентности опухолей к РК – такие как изменения в ко-

активаторах РК, изменения в метаболизме и роль неканонического сигналинга в резистентности. После анализа литературы автор обосновывает выбор модели для дальнейшего исследования. Обзор очень подробно написан, но в то же время легок для чтения. Также облегчают понимание материалы иллюстрации сигнальных каскадов.

В разделе «Материалы и методы» диссертант подробно описывает использованные в работе методы: наработка плазмидной ДНК и трансфекция, лентивирусная трансдукция, иммуноблоттинг, проточная цитофлуориметрия, ПЦР в реальном времени, бисульфитное секвенирование и ингибиторный анализ. Приведенные протоколы очень подробны и позволяют воспроизвести полученные результаты. Данный раздел показывает высокий технический уровень диссертации и владение диссертанта передовыми методами молекулярной и клеточной онкологии.

Затем автор представляет результаты своего исследования. Вначале автор показывает, что клетки линий нейробластомы, но не опухолей яичника, легкого и глиобластом чувствительны к действию РК. Затем в работе показана высокая экспрессия белков CRABP1 и 2 в чувствительных линиях нейробластом, но не резистентных линиях рака легкого. Дополнительно были проанализированы линии рака яичника, OVCAR-3, OVCAR-4, OVCAR-8, SK-OV-3 и EFO-21, где только у линий OVCAR-3 и OVCAR-4 наблюдалась высокая экспрессия CRABP1/2 и они же обладали наибольшей чувствительностью к РК. Такой же анализ был проведен для клеток линий рака молочной железы, где наибольшей чувствительностью обладали линии SKBR3 и T47D. Для чувствительных и нечувствительных линий было проанализировано распределение клеток в клеточном цикле, показавшее увеличение G1 фазы и subG1 фракций в чувствительных клетках SKBR3 и MCF7, но не в резистентных клетках MDA-MB-231. При этом при действии РК на MCF7 преобладала апоптотическая гибель (подтвержденная окраской на аннексин-пропидий), а при действии на SKBR3 – G0/G1 блок клеточного цикла.

Затем в диссертации рассматривалась корреляция экспрессии CRABP1/2 и РК-чувствительности линий рака молочной железы. Во всех РК-чувствительных линиях (SKBR3, T47D, MCF7 и HCC1954) CRABP1 либо исходно экспрессируется на высоком уровне, либо восстанавливает экспрессию при деметилировании гена. В менее чувствительных клетках - HCC1937, MDA-MB-453 и MDA-MB468 метилирование

отсутствует и наблюдается различный уровень экспрессии CRABP1. В максимально резистентных линиях CRABP1 не детектируется, репрессия гена реализуется, по-видимому, за счет нескольких механизмов эпигенетической регуляции. Сходный профиль экспрессии наблюдался и для CRABP2. При этом клетки, демонстрирующие выраженную продукцию CRABP2, характеризуются высоким уровнем CRABP1, а в клетках с низким уровнем CRABP2 продукция CRABP1 практически отсутствует. Корреляция экспрессии CRABP1 и CRABP2 была подтверждена данными статистического анализа, а также с помощью нокдауна этих генов, который выявил CRABP2-зависимую регуляцию экспрессии CRABP1. Автором также было показано, что для ряда линий экспрессия CRABP1 была эпигенетически подавлена, и это подавление можно ограничить с помощью эпигенетических ингибиторов. Чтобы доказать механизм влияния CRABP1/2 на чувствительность клеток к РК, диссертант также проводил экзогенную экспрессию и нокдаун этого гена в чувствительных и резистентных клетках. Экзогенная экспрессия CRABP1 увеличивала резистентность к РК, в то время как увеличение уровня CRABP2 способствовало большей чувствительности.

В следующей части работы автор показывает корреляцию уровня *RARalpha* с чувствительностью к РК, и *RARbeta* с резистентностью к РК. Также показано, что в группе РК-чувствительных линий уровень экспрессии *CYP26A1* был существенно выше, чем в резистентных линиях ($p < 0,001$), при действии РК, но не в его отсутствии. Эти данные позволяют использовать эти гены как маркеры чувствительности к РК.

В последней части работы автор анализирует влияние РК на активацию АКТ и ERK киназ в чувствительных и резистентных линиях. По результатам исследования РК-зависимая краткосрочная активация показана для обеих киназ и для всех исследуемых клеток.

В конце автор делает конкретные выводы, которые являются логичными и обоснованными и вытекают из полученных результатов и их обсуждения. Ключевые итоги исследования изложены в разделах «Заключение» и «Выводы».

К работе имеется ряд вопросов:

1. Вопрос – можно ли использовать активаторы и ингибиторы *CYP26A1* для изменения чувствительности опухолей к РК?

2. Учитывая активацию AKT и ERK от PK, ожидается ли синергитический эффект от применения PK с ингибиторами AKT и ERK?
3. Насколько эффекты, полученные на опухолях рака молочной железы, будут переноситься на другие опухоли? Возможно ли предсказание более чувствительных опухолей по экспрессии CRABP1/2, RARalpha/beta и CYP26A1?


Данные вопросы носят дискуссионный характер и не влияют на высокую оценку данной работы.

Таким образом, диссертация Еникеева Аделя Дамировича «Роль белков CRABP и других компонентов сигнального пути ретиноевой кислоты в развитии резистентности опухолевых клеток к ретиноевой кислоте» является цельной и законченной научно-квалификационной работой, и имеет безусловную научно-практическую ценность. Диссертация Еникеева А.Д. полностью соответствует требованиям пункта 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 года №842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор, Еникеев Адель Дамирович, несомненно заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности специальности 3.1.6. Онкология, лучевая терапия.

Официальный оппонент:

Старший научный сотрудник, заведующий лабораторией молекулярной онкобиологии, Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биологии гена Российской академии наук, ул. Вавилова, 34/5, Москва, 119334. Email: tatarskii@gmail.com, телефон: +79165535786

Кандидат биологических наук
(специальность 14.01.12 – онкология)

 Татарский Виктор Вячеславович
25.07.2024 г.

