

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 21.1.032.01 (Д 001.017.01),
СОЗДАННОГО НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО
БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ «НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ОНКОЛОГИИ ИМЕНИ Н.Н. БЛОХИНА»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ, ПО
ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА
БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от «30» июня 2022г., № 16

О присуждении Оглоблиной Анне Максимовне, гражданке Российской Федерации, ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Мультитаргетные эффекты G4-аптамеров и их противоопухолевая активность *in vitro*» по специальности 3.1.6. Онкология, лучевая терапия принята к защите 07 апреля 2022 года (протокол заседания №8) диссертационным советом 21.1.032.01 (Д 001.017.01), созданным на базе федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России), 115522, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24, приказ о создании диссертационного совета №105/нк от 11.04.2012 г., №561/нк от 03.06.2021 г.

Соискатель Оглоблина Анна Максимовна, «01» ноября 1989 года рождения.

В 2012 году соискатель окончила федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» по специальности «Химия».

Работает в должности младшего научного сотрудника лаборатории механизмов химического канцерогенеза отдела химического канцерогенеза

научно-исследовательского института (НИИ) канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Диссертация выполнена в лаборатории механизмов химического канцерогенеза отдела химического канцерогенеза НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Научный руководитель

- доктор медицинских наук Якубовская Марианна Геннадиевна, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, научно-исследовательский институт канцерогенеза, отдел химического канцерогенеза, заведующая.

Официальные оппоненты:

Боженко Владимир Константинович, доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научный центр рентгенорадиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, научно-исследовательский отдел молекулярной биологии и экспериментальной терапии опухолей, заведующий;

Спиридонова Вера Алексеевна, доктор биологических наук, доцент, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, отдел хроматографического анализа, старший научный сотрудник

дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства», г. Москва, в своем положительном отзыве, подписанном Варижук Анной Михайловной, доктором химических наук, заведующей лабораторией искусственного антителогенеза, указала, что диссертационная работа является научно-квалификационной

работой, в которой на основании выполненных автором исследований и разработок осуществлено решение научной задачи установления плейотропного эффекта G4-аптамеров, имеющей существенное значение для развития онкологии. Все поставленные задачи выполнены, заявленная цель достигнута. Выводы соответствуют поставленным задачам. По актуальности, научной и практической ценности полученных результатов диссертация соответствует всем требованиям пп. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утверждённого постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013г. (в редакции постановлений Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016г. № 335, от 20 марта 2021г. № 426), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а её автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 3.1.6. Онкология, лучевая терапия.

Соискатель имеет 9 опубликованные работы, в том числе по теме диссертации опубликовано 6 работ, из них в рецензируемых научных изданиях опубликовано 6 работ.

В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных Оглоблиной Анной Максимовной работах. Научные публикации написаны в соавторстве, при личном вкладе соискателя не менее 85 %, объем научных изданий составляет 5,5 печатных листа. В опубликованных работах отражены современные данные о роли G-квадруплексов регуляции ключевых процессах жизнедеятельности клетки, представлен обзор физико-химических методов исследования свойств G-квадруплексов, представлены результаты исследования термостабильности G-квадруплекса в составе дуплексной ДНК, установлено формирование данных структур, а также продемонстрировано влияние G-квадруплексов на процессы репарации ошибочно спаренных нуклеотидов, представлены данные о структуре G4-аптамеров, плейотропном эффекте G4-аптамеров, их способности ингибировать транскрипционную активность фактора STAT3 и активность топоизомеразы 1 (TOP1), фермента системы контроля

топологического состояния ДНК. В данной работе продемонстрирована способность G4-аптамеров блокировать процесс репликации ДНК, а также представлены данные об избирательности цитотоксического действия G4-аптамеров на опухолевые клетки, приведены результаты исследований противоопухолевой активности G4-аптамеров к нуклеолину, в том числе G4-аптамера AsGGG, приведены исследования структуры G4-аптамеров, подтверждена избирательность цитотоксического действия G4-аптамеров на опухолевые клетки, представлены данные по влиянию G4-аптамеров на активность топоизомеразы 1 (TOP1), представлены исследования стабильности G4-олигонуклеотидов и продемонстрирована возможность формирования Н-структур гуаниг-богатыми участками ДНК, определены последовательности наиболее распространенных в геноме G4-мотивов, установлены локализация каждого G4-мотива и число ассоциированных генов с наиболее распространенными G4-мотивами, продемонстрирована возможность лигандов, способных стабилизировать G-квадруплексы, подавлять экспрессию функционально независимых онкогенов, в промоторе которых расположены G4-мотивы, представлен обзор об ассоциации G-квадруплексов и процессов, приводящих к развитию онкологических заболеваний.

Наиболее значимые работы по теме диссертации:

1. Pavlova, A.V. Responses of DNA Mismatch Repair Proteins to a Stable G-Quadruplex Embedded into a DNA Duplex Structure / A.V. Pavlova, M.V. Monakhova, **A.M. Ogloblina**, N.A. Andreeva, G.Y. Laptev, V.I. Polshakov, N.G. Dolinnaya // International Journal of Molecular Sciences. — 2020. — № 21(22). — P. 8773-8799.
2. **Ogloblina, A.M.** Toward G-Quadruplex-Based Anticancer Agents: Biophysical and Biological Studies of Novel AS1411 Derivatives. / A.M. Ogloblina, N. Iaccarino, D. Capasso, S. Di Gaetano, E.U. Garzarella, N.G. Dolinnaya, A. Randazzo // International Journal of Molecular Sciences. — 2020. — №21(20). — P. 7781-7803.
3. **Ogloblina, A.M.** Multi-targeted effects of G4-aptamers and their antiproliferative activity against cancer cells. / A.M. Ogloblina, A.N. Khristich, N.Y.

Karpechenko, S.E. Semina, G.A. Belitsky, N.G. Dolinnaya, M.G. Yakubovskaya // Biochimie. 2018. — №145. — P. 163-173.

4. Dolinnaya, N.G. Structure, properties, and biological relevance of the DNA and RNA G-quadruplexes: Overview 50 years after their discovery. / N.G. Dolinnaya, A.M. Ogloblina, M.G. Yakubovskaya // Biochemistry (Moscow). — 2016. — №13. — C.1602-1649.

5. **Ogloblina, A.M.** Parallel G-quadruplexes formed by guanine-rich microsatellite repeats inhibit human topoisomerase I. / A.M. Ogloblina, V.A. Bannikova, A.N. Khristich, T.S. Oretskaya, M.G. Yakubovskaya, N.G. Dolinnaya // Biochemistry (Moscow). — 2015. — №8. — P. 1026-1038.

6. Pandey, S. Transcription blockage by stable H-DNA analogs in vitro / S. Pandey, A.M. Ogloblina, B.P. Belotserkovskii, N.G. Dolinnaya, M.G. Yakubovskaya, S.M. Mirkin, P.C. Hanawalt // Nucleic Acids Research. — 2015. — №14. — P.6994-7004.

На диссертацию и автореферат поступил отзывы из:

федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт цитологии Российской академии наук, г. Санкт-Петербург. Отзыв подписан Шуваловым Олегом Юрьевичем, кандидатом биологических наук, старшим научным сотрудником лаборатории регуляции экспрессии генов и лаборатории молекулярной медицины. В отзыве указано, что диссертационная работа представляет собой самостоятельное законченное научное исследование, выполненное по актуальной теме современной медицинской науки, полностью соответствует требованиям п.9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. №842 (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 кандидата наук, а ее

автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 3.1.6. Онкология, лучевая терапия;

федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, г. Москва. Отзыв подписан кандидатом физико-математических наук, ведущим научным сотрудником лаборатории ДНК- белковых взаимодействий Калюжным Дмитрием Николаевичем. В отзыве указано, что диссертационная работа представляет собой самостоятельное законченное научное исследование, выполненное по актуальной теме современной медицинской науки, полностью соответствует требованиям п.9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. №842 (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 кандидата наук, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 3.1.6. Онкология, лучевая терапия.

Отзывы целиком положительные, замечаний нет.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается тем, что Боженко Владимир Константинович, доктор медицинских наук, профессор, и Спиридонова Вера Алексеевна, доктор биологических наук, доцент, выбраны из числа компетентных в соответствующей отрасли науки ученых, являются экспертами по специальности диссертации, имеющих публикации в соответствующей сфере исследования и давших на это свое согласие.

Ведущая организация, федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства», г. Москва, выбрана как центр, широко известный своими достижениями в области клинической

онкологии, способный определить научную и практическую ценность диссертации, и имеющий ученых, являющихся безусловными специалистами по теме защищаемой диссертации, что подтверждается наличием научных трудов по рассматриваемым в диссертации проблемам.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

разработан алгоритм анализа специфичности и направленности действия G4-аптамеров, предлагаемых в качестве ингибиторов белков, вовлеченных в процессы канцерогенеза.

Предложены оптимальные и наиболее рациональные методы биоинформационического анализа распространенности гуанин-богатых последовательностей ДНК, способных формировать G-квадруплексы; отработаны условия анализа пространственной конформации G4-аптамеров, разрабатываемых в качестве ингибиторов белков-мишеней противоопухолевой терапии.

Доказаны: (1) существование в геноме человека одинаковых по своей структуре G4-мотивов, входящих в состав несколькихprotoонкогенов, что обеспечивает кластерность регуляции экспрессии генов путем формирования G-квадруплексов; (2) плейотропность действия G4-аптамеров, что обуславливает необходимость более широкого анализа специфичности действия G4-аптамеров, разрабатываемых в качестве ингибиторов определенного G4-распознающего белка-мишени противоопухолевой терапии, в отношении и других G4-распознающих белков; (3) избирательность цитотоксического действия G4-аптамеров на опухолевые клетки в сравнении с условно нормальными иммортилизованными клетками.

Введены в рутинную практику методы: (1) репортерного анализа влияния G4-аптамеров на активность белка STAT3; анализа влияния G4-аптамеров на активность белка TOP1 по релаксации сверхспирализованной плазмидной ДНК.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

доказаны положения, вносящие существенный вклад в понимание функционирования G4-мотивов в геноме человека, и наличие интерференции в функционировании G4-распознающих белков.

Применительно к проблематике диссертации результативно **использован** метод биоинформационического анализа базы данных human genome GRCh37/hg19 с применением алгоритма скользящего окна для выявления последовательностей интереса.

Изложены убедительные доказательства того, что аптамеры, обладающие структурным элементом G-квадруплекса, обладают мультинаправленным действием на опухолевую клетку, и способны ингибировать несколько белковмишеней.

Раскрыты основные преимущества использования G4-аптамеров как противоопухолевых агентов за счет «широкого терапевтического окна», что было доказано на двух клеточных линиях - клетки adenокарциномы молочной железы (MCF-7) и на условно-нормальные иммортилизованные клетки эпителия молочной железы (MCF-10A).

Изучены эффекты оказываемые G4-аптамерами на процессы, протекающие в опухолевых клетках (процесс репликации и деления клетки) в зависимости от их структурных особенностей.

Проведена модернизация подходов к определению потенциально биологически-активных G4-аптамеров на основе информации об их структурно-конформационных особенностях.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:

Разработаны и внедрены рекомендации по методологии отбора и определения плейотропности G4-аптамеров.

Определены перспективы практического использования полученных результатов для разработки потенциальных противоопухолевых агентов на основе G4-аптамеров.

Создан и представлен модифицированный аптамер AS-GGG, который обладает высокой противоопухолевой активностью в отношении клеток аденокарциномы молочной железы (MCF-7) и в сравнимом диапазоне концентраций не влияет на жизнеспособность условно-normalных иммортализованных клеток эпителия молочной железы (MCF-10A).

Оценка достоверности результатов исследования выявила:

Работа выполнена на высоком методологическом уровне, на достаточном по количеству наблюдений экспериментальном материале, использованные методики соответствовали поставленным задачам.

Теория построена на известных проверенных данных, о том, что в исследованиях последнего десятилетия показано, что взаимодействие ряда ферментов с G4, в том числе и экзогенными, может влиять на такие клеточные процессы как транскрипция (SP1, NMP1), трансляция (FXR1P, Pat1, hnRNP A), репликация (RecQ, Pif1), рекомбинации (RecA), передача сигнала о повреждении ДНК (PARP1).

Идея базируется на детальном анализе результатов наиболее значимых исследований G4-аптамеров, опубликованных научных работах о разработке G4-аптамеров к таким белкам, как нуклеолин, STAT3, SHP2 и другие потенциальным мишениям противоопухолевой терапии.

Использованы адекватные физико-химические и молекулярно-биологические методы анализа свойств и структуры соединений, предлагаемых в качестве противоопухолевых агентов, а также современные методы биоинформатического анализа последовательности генома человека.

Установлено, что изученные G4-аптамеры, разработанные к различным белкам-мишениям таргетной терапии, обладают плейотропным механизмом действия в клетке. G4-аптамеры AS1411, G4-SP1, G4-STAT3 и G4-TGT, G4-CCC значительно снижают транскрипционную активность фактора STAT3. Все G4-аптамеры, использованные в представленном исследовании эффективно ингибируют активность TOP1.

Использованы комплексный анализ с применением современных физико-химических и молекулярно-биологических методов для изучения свойств новых противоопухолевых агентов на основе G-квадруплексов. В частности, для изучения физико-химических характеристик перехода В-ДНК в G4-форму были использованы: круговой дихроизм (CD), УФ-плавление, метод вытеснения флуоресцентного индикатора (FID). При изучении роли формирования G4 в регуляции экспрессии онкогенов были применены следующие молекулярно-биологические методы: количественная обратно-транскриптазная ПЦР, клонирование, очистка и выделение ДНК и РНК, культивирование клеточных линий, трансдукция, трансфекция, исследование с использованием люциферазных репортерных конструкций. Биоинформационный анализ проводили методами компьютерного анализа баз данных генома человека (human genome GRCh37/hg19). Полученные данные представлены как среднее значение со стандартным отклонением ($M \pm SD$). Нормальность распределения оценивали с помощью критерия Колмогорова-Смирнова и критерия Шапиро-Уилка. Статистическую обработку данных проводили с использованием программного обеспечения Statistica10 (StatSoft, США). Были использованы t-критерий Стьюдента и дисперсионный анализ ANOVA с поправкой Бонферрони, различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Личный вклад соискателя состоит в планировании всех этапов диссертационной работы, проведении анализа отечественной и зарубежной литературы по данной научной тематике, непосредственном формулировании целей и задач диссертационного исследования. В диссертационной работе обсуждены и обобщены результаты, полученные лично автором или в соавторстве. Автору принадлежит основная роль на всех этапах работы: от выбора направления и объектов исследования, постановки задачи, планирования, разработки и обоснования пути решения, проверки предложенных в работе экспериментальных подходов, проведении исследования, до обсуждения и оформления полученных результатов. Лично автором или при активном участии

автора была проведена подготовка всех публикаций по выполненной диссертационной работе.

Соискатель Оглоблина Анна Максимовна ответила на задаваемые ей в ходе заседания вопросы и привела собственную аргументацию.

На заседании «30» июня 2022 года диссертационный совет принял решение: за решение научной задачи по установлению плейотропного эффекта G4-аптамеров, имеющей важное значение для развития онкологии, присудить Оглоблиной А.М. ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 17 человек, из них 7 докторов наук по специальности 3.1.6. Онкология, лучевая терапия «биологические науки», участвовавших в заседании, из 25 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за 17, против - нет, недействительных бюллетеней - нет.

Председательствующий
заместитель председателя
диссертационного совета,
д.б.н., профессор

Красильников Михаил Александрович

Ученый секретарь
диссертационного совета,
д.м.н., профессор

Кадагидзе Заира Григорьевна

30 июня 2022 г.

