

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Галембиковой Айгуль Рафиковны «Механизмы чувствительности клеток гастроинтестинальных стромальных опухолей к ингибиторам ДНК-топоизомеразы II типа», представленную на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.01.12 – онкология в диссертационный совет Д001.017.01 на базе ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Актуальность темы исследования.

Гастроинтестинальные стромальные опухоли (ГИСО) составляют до 1% от всех злокачественных новообразований ЖКТ, а занимают одно из ведущих мест среди сарком мягких тканей органов ЖКТ. Основным звеном патогенеза данных новообразований является активирующая мутация гена тирозинкиназного рецептора c-KIT (CD117), что приводит к пролиферации опухолевых клеток и ингибирует их гибель по механизму апоптоза. Поэтому основным патогенетическим принципом их терапии является ингибирование активности вышеуказанного рецептора с помощью неселективного таргетного препарата иматиниба мезилата (ИМ), показавшего свою эффективность в том числе, в терапии с распространенными, метастатическими и рецидивирующими формами ГИСО. Тем не менее, длительное использование данного препарата имеет существенные ограничения, обусловленные частым (более чем в 50% случаев) развитием вторичной резистентности опухолевых клеток спустя 2 года после начала проведения таргетной терапии. В то же время эффективность других нехирургических методов терапии данных новообразований остается невысокой. Например, согласно данным литературы, эффективность использования химиопрепаратов в лечении больных ГИСО остается невысокой и варьирует от 0 до 27%. Тем не менее, следует подчеркнуть, что эти данные были получены на основании исследований, проведенных до выявления основного диагностического иммуногистохимического критерия, основанного на выявлении гиперэкспрессии c-KIT (CD117), являющегося в настоящее время общепризнанным маркером ГИСО, используемым в рутинной диагностике данных новообразований, что позволяет дифференцировать их от других гладкомышечных и нейрогенных новообразований (лейомиома, лейомиосаркома и шваннома). В этой связи диссертационная работа Галембиковой А.Р., посвященная оценке чувствительности клеток ГИСО к химиопрепаратам группы ингибиторов ДНК-топоизомеразы II типа, а также изучению молекулярных механизмов выявленной чувствительности, в том числе, на клетках ГИСО, резистентных к ИМ, несомненно является актуальной.

Научная новизна исследования.

В исследовании автором впервые представлены сведения о том, что клетки ГИСО характеризуются повышенным уровнем экспрессии топоизомераз II типа, принимающих участие в репликации ДНК, что можно расценивать как потенциальную мишень для воздействия ингибиторов ДНК-топоизомеразы II типа. В исследовании было также выявлено, что клетки ГИСО имеют нарушения в системе репарации двунитевых разрывов (ДНР) ДНК, а именно, в механизмах гомологичной рекомбинации, что также иллюстрирует потенциальную чувствительность ГИСО к воздействию ДНК-повреждающих агентов, в первую очередь, ингибиторов ДНК-топоизомеразы II типа. В ходе дальнейшего выполнения работы автором была доказана чувствительность клеток ГИСО к ингибиторам ДНК-топоизомеразы II типа доксорубину и этопозиду, в том числе, у ИМ-резистентных опухолевых клеток. Впервые показано, что ИМ обладает способностью влиять на эффективность процессов репарации ДНР ДНК. Таким образом, способность ИМ ингибировать гомологичную рекомбинацию является основным молекулярным механизмом, обеспечивающим чувствительность клеток ГИСО к действию ингибиторов ДНК-топоизомеразы II типа на фоне развития вторичной резистентности ГИСО к ИМ.

Теоретическая и практическая значимость результатов, полученных автором диссертационной работы.

Полученные в диссертационном исследовании результаты значительно расширяют представление о механизмах действия таргетного препарата ИМ и опровергают мнение о химиорезистентности ГИСО. В практическом плане результаты исследования могут быть использованы для решения проблемы первичной и вторичной резистентности к ИМ у больных с ГИСО, открывая новые возможности для разработки комбинированных схем лечения, основанных на сочетании таргетной и химиотерапии ингибиторами ДНК-топоизомеразы II типа.

Оценка содержания диссертации, её структуры и завершенности.

Диссертационная работа Галембиковой А.Р. представляет собой самостоятельное научное исследование, соответствующее требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям. Работа изложена на 148 страницах машинописного текста и построена по традиционному плану, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов исследования, обсуждения полученных результатов, заключения, выводов и списка цитированной литературы, включающего 262 источника, из которых 243 зарубежных авторов. Диссертация проиллюстрирована 10 таблицами и 21 рисунками. Все главы взаимосвязаны и логически последовательны.

В первой главе автор подробно рассматривает и анализирует литературные данные, касающиеся рассматриваемых в диссертационной работе вопросов, а именно происхождение ГИСО и современные принципы терапии данного заболевания. Отдельный раздел посвящен механизмам формирования резистентности ГИСО к ИМ. Обзор достаточно широко охватывает сведения по изучаемым вопросам, легко читается и вводит читателя в круг исследуемых автором проблем, делая работу логично сформулированной.

В главе «Материалы и методы исследования» детально описаны методы, которые адекватны поставленным задачам и цели диссертационного исследования. Использованный автором набор современных методов позволил провести оценку жизнеспособности клеток, уровня экспрессии белков, оценку эффективности гомологичной рекомбинации ДНК, многопараметрический анализ клеточных культур в режиме реального времени, а также оценка уровня экспрессии генов. Полученные результаты обработаны с помощью современных методов статистического анализа.

В главах «Результаты собственных исследований» и «Обсуждение полученных результатов» автором изложены результаты диссертационного исследования и дано их обсуждение. Автор аргументированно доказывает, что ингибиторы ДНК-топоизомеразы II типа обладают цитотоксическим эффектом в отношении клеток ГИСО, в том числе, и у резистентных к ИМ клеточных линиях. Механизм чувствительности клеток ГИСО к данным химиопрепаратам обусловлен имеющимися дефектами в системе репарации ДНР ДНК и гиперэкспрессией топоизомераз II типа. Автором обнаружено, что ИМ способен ингибировать процесс гомологичной рекомбинации ДНК и показано, что пре-инкубация клеток ГИСО в присутствии ИМ повышает чувствительность этих клеток к цитотоксическому действию ингибиторов ДНК-топоизомеразы II типа – доксорубицину и этопозиду. Причем эффективность комбинации этих препаратов наблюдалась и у ИМ-резистентных клеток ГИСО. Однако наибольший проапоптотический эффект был выявлен у чувствительных к ИМ линиях ГИСО. Автор связывает это с общими механизмами формирования устойчивости опухолевых клеток к лекарственным препаратам и оценивает роль белков АВС-транспортёров и генов, участвующих в репарации повреждений ДНК и регуляции клеточного цикла. Поскольку клеточные линии ГИСО имели различное происхождение и мутационный статус *KIT*, автор из ИМ-чувствительного клона выделяет суб-линию, обладающую фенотипическими признаками устойчивости к ИМ. Использование резистентной суб-линии позволило получить результаты, свидетельствующие о том, что значительный вклад в развитие меньшей чувствительности ИМ-резистентных клеток ГИСО к доксорубицину и этопозиду вносят белки-транспортёры, а также активация системы репарации повреждений ДНК и регуляции клеточного цикла. В ИМ-резистентной суб-линии наблюдалось повышение экспрессии транспортёров *ABCG-2* и *MRP-7*, играющих

значительную роль в развитии множественной лекарственной устойчивости (МЛУ). Наряду с этим автором выявлено, что дочерняя суб-линия усиленно экспрессирует гены *XRCC3* и *Rad51*, которые участвуют в гомологичной рекомбинации ДНК, обуславливая высокую эффективность процессов репарации ДНР ДНК, вызванных ингибиторами ДНК-топоизомеразы II типа. А экспрессия генов, участвующих в остановке клеточного цикла и запуска апоптоза (*CDKN1A* и *TP73*) подавлена, что приводит к повышенной пролиферации опухолевых клеток и тоже способствует развитию устойчивости клеток к химиопрепаратам.

Результаты исследований подробно описаны и иллюстрированы рисунками и таблицами. Все выводы диссертационной работы логично вытекают из полученных данных и соответствуют представленным результатам.

Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и заключений.

В диссертационной работе Галембиковой А.Р. использованы современные методы биохимических исследований, полностью соответствующие поставленной цели и задачам и способствующие адекватному подходу к их решению. Представленные в диссертации результаты получены на достоверном количестве экспериментального материала и подтверждены данными, проиллюстрированными рисунками и сведенными в таблицы, составленные с соблюдением всех необходимых требований. Научная новизна и достоверность полученных в диссертации данных не вызывает сомнений. Выводы соответствуют полученным результатам.

По теме исследования опубликовано 14 научных работ, в том числе 10 статей в рецензируемых журналах, включенных в перечень ВАК РФ. Кроме того, результаты и выводы диссертационной работы представлялись для обсуждения на международных и отечественных конференциях и конгрессах. В целом, рецензируемая диссертация не вызывает замечаний принципиального характера.

Замечания по содержанию и оформлению диссертационной работы.

Вместе с тем, имеются некоторые вопросы, пожелания и частные замечания:

1. При проведении вестерн-блот анализа для контроля белковой нагрузки использовали антитела к актину, количество которого варьировало незначительно в опухолевых образцах. Для интерпретации результатов по изучению экспрессии исследуемых белков с помощью вестерн-блот анализа желательно было бы провести нормализацию белковой нагрузки целевого белка на актин с помощью соответствующих программ.
2. В работе были использовано ограниченное количество клеточных линий ГИСО, обладающих значительной молекулярной гетерогенностью, в том числе по состоянию систем репарации повреждений ДНК. Использование большего количества клеточных линий для исследования уровня экспрессии белков репарации и изучения чувствительности к

ингибиторам ДНК-топоизомеразы II типа позволило бы существенно расширить понимание молекулярных механизмов чувствительности/резистентности ГИСО к химиотерапии.

3. Авторы изучали молекулярные механизмы увеличения чувствительности клеток ГИСО к действию ингибиторов ДНК-топоизомеразы II-типа в присутствии ИМ и показали, что ИМ способен ингибировать репарацию ДНР за счет снижения продукции рекомбиназы Rad51, в том числе, за счет ее протеасомной деградации. Для доказательства образования ДНР под действием ингибиторов и, чтобы исключить вероятность образования дополнительных ДНР под действием ИМ, было бы желательно использовать методы регистрации повреждения ДНК, в частности метод ДНК-комет.

4. В списке сокращений присутствуют ошибки, например, ИТК – расшифровывается как додецилсульфата натрия, а ГИСО как феназинметсульфат.

5. В тексте присутствует небольшое количество грамматических ошибок, опечаток и англицизмов, например, «transfer buffer» можно вполне заменить на «буфер для переноса», а SDS на ДСН – додецилсульфат натрия.

6. Развитие вторичной резистентности к ИМ может быть обусловлено различными механизмами, в том числе, появлением вторичных мутаций в генах *KIT* и *PDGFR*. Проверили ли наличие этих мутаций в ИМ-резистентной суб-линии и какие еще механизмы возникновения вторичной резистентности к ИМ могут быть по вашему мнению?

Соответствие содержания автореферата основным положениям диссертации.

В автореферате отражены все основные разделы и положения диссертационной работы Галембиковой А.Р. «Механизмы чувствительности клеток гастроинтестинальных стромальных опухолей к ингибиторам ДНК-топоизомеразы II типа».

Заключение.

Таким образом, в представленной диссертационной работе логично поставлены и успешно решены заявленные цель и задачи по изучению механизмов чувствительности клеток ГИСО к ингибиторам ДНК-топоизомеразы II типа.

Диссертация соответствует Паспорту научной специальности 14.01.12 – онкология (п. 2. «Исследования по изучению этиологии и патогенеза злокачественных опухолей, основанные на достижениях ряда естественных наук (генетики, молекулярной биологии, морфологии, иммунологии, биохимии и др.)» и п. 6. «Внедрение в клиническую практику достижений фармакологии в области создания и использования цитостатиков, гормонов, биологически активных препаратов»).

Учитывая актуальность выполненного исследования, новизну полученных данных, их значимость, считаю, что диссертационная работа Галембиковой Айгуль Рафиковны «Механизмы чувствительности клеток гастроинтестинальных стромальных опухолей к ингибиторам ДНК-топоизомеразы II типа», представленную на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук по специальности 14.01.12 – онкология, является самостоятельной законченной научно-квалификационной работой, содержащей решение научной задачи, имеющей важное значение для фундаментальной и клинической онкологии. Рассматриваемая работа по актуальности, научной новизне, уровню проведенных исследований, теоретической и практической значимости полностью отвечает 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 кандидатским диссертациям, а ее автор, Галембикова Айгуль Рафиковна, заслуживает присуждения искомой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.01.12 – онкология.

Официальный оппонент:

доктор биологических наук, старший научный сотрудник
(специальность 03.01.03 – молекулярная биология)
заведующий кафедрой биохимии,
биотехнологии и фармакологии
Института фундаментальной медицины и биологии
Казанского федерального университета

Р.Г. Киямова

420008, Россия, г. Казань, ул. Кремлевская, д. 18
тел.: +7 (987) 4247984
e-mail: kiyamova@mail.ru

«30» 04 2019 г.

