

## **Отзыв официального оппонента**

на диссертацию **Лесовой Екатерины Андреевны**

**«Модулирование активации глюкокортикоидного рецептора в химиотерапии гемобластозов»**, представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 14.01.12 - онкология

### **Актуальность темы**

Несмотря на значительный прогресс в лечении онкологических заболеваний и появление новых перспективных противоопухолевых препаратов, глюкокортикоиды (GC) по-прежнему остаются одним из ключевых компонентов лечения злокачественных новообразований кроветворной системы, а также активно используются в составе адъювантной терапии других типов опухолей. Однако длительное применение GC зачастую приводит к развитию многочисленных побочных эффектов, которые реализуются преимущественно через взаимодействие GC с глюкокортикоидным рецептором (GR) и последующей индукции транскрипции таргетных генов по механизму транс-активации, в то время как терапевтический эффект GC связывают с запуском GR-зависимой транс-репрессии, заключающейся во взаимодействии GR с различными транскрипционными факторами и снижении пролиферативной активности опухолевых клеток. Поиск и разработка новых препаратов, позволяющих сдвинуть баланс механизмов транс-активации и транс-репрессии в пользу последнего, является перспективным направлением исследований и позволит снизить степень выраженности метаболических осложнений при применении терапии глюкокортикоидами и повысить безопасность и эффективность химиотерапии лейкозов и лимфом.

Другим важнейшим направлением исследований в этой научной области является выявление и изучение тех генов, которые активно реагируют на транс-активацию глюкокортикоидного рецептора и ассоциированы с развитием побочных эффектов GC. Разработка ингибиторов экспрессии таких GR-зависимых генов, опосредующих развитие побочных эффектов GC, является альтернативным подходом, направленным на повышение эффективности применения

глюкокортикоидных препаратов и улучшение качества жизни пациентов с онкологическими заболеваниями.

Таким образом, анализ молекулярных механизмов действия глюкокортикоидного рецептора и возможностей использования селективного модулирования его функциональной активности для оптимизации химиотерапии злокачественных новообразований кроветворной системы, лежащий в основе диссертационной работы Лесовой Е.А., является актуальнейшей задачей современной экспериментальной онкологии.

### **Научная новизна, теоретическая и практическая значимость исследования.**

В диссертационной работе Лесовой Е.А. были гармонично объединены оба подхода к изучению механизмов действия и совершенствованию клинического применения глюкокортикоидных препаратов.

Был проанализирован целый ряд селективных агонистов глюкокортикоидного рецептора (SEGRA), которые представляют собой достаточно большой и разнородный химический класс соединений, объединяющий молекулы по их способности селективно запускать механизм транс-репрессии GR, при котором рецептор вступает во взаимодействие с другими транскрипционными факторами, препятствуя их связыванию с ДНК. Особое внимание в данной работе было уделено исследованию наименее изученного представителя класса SEGRA, называемого SpdA, впервые был проведен синтез его оптических изомеров и 8 более стабильных химических производных и изучены их противоопухолевые свойства, выявлен наиболее перспективный кандидат SpdA-03 для дальнейших доклинических исследований.

Также проведен биоинформатический скрининг базы данных CMap и идентифицированы 9 потенциальных фармакологических ингибиторов экспрессии гена REDD1, который значительно активируется под действием GC и вовлечен в развитие побочных эффектов GC. Впервые показано, что один из этих ингибиторов (рапамицин) способен подавлять экспрессию REDD1 и модулировать функциональную активность GR, при этом применение рапамицина в комплексе с

GC выявило их синергический противоопухолевый эффект *in vitro* и *in vivo*, а также подавляло атрофические побочные эффекты GC *in vivo*.

Полученные автором данные свидетельствуют о перспективности дальнейших доклинических испытаний CpдA-03 и рапамицина в качестве потенциальных новых лекарственных препаратов для терапии злокачественных новообразований кроветворной системы и препаратов сопровождающей терапии для снижения побочных эффектов применения глюкокортикоидов.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертационная работа Лесовой Е.А. выполнена на высоком профессиональном уровне, достоверность полученных результатов не вызывает сомнений. Работа построена в традиционной форме и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов исследования, обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Диссертация изложена на 304 страницах, содержит 61 рисунок и 15 таблиц. Библиографический указатель включает ссылки на 757 отечественных и зарубежных источника литературы.

Во введении автор обосновывает актуальность проблемы, четко формулирует цель и задачи исследования, а также отражает научную новизну и практическую значимость работы.

Литературный обзор представлен на 94 страницах и посвящен изложению современных представлений о структуре, свойствах и биологической активности GR, он дает представление о влиянии глюкокортикоидного рецептора на сигнальные пути, нарушения в которых способствуют злокачественной трансформации клетки и свидетельствует о хорошем знании автором современной научной литературы. Также автор описывает известные SEGRA и их противоопухолевые и противовоспалительные эффекты на различных моделях, уделяет внимание генам, GC-индуцированная экспрессия которых лежит в основе развития побочных эффектов глюкокортикоидов. Приведены подходы к поиску новых противоопухолевых препаратов с помощью репрофилирования, отмечены наиболее интересные и перспективные случаи, механизм биологической активности CG, в том числе и в клетках иммунной системы.

Глава «Материалы и методы» представлена на 21 странице и содержит подробное описание методик, использованных в диссертационной работе. Автор использовал широкий спектр современных биоинформатических и молекулярно-биологических методов исследования, включая ОТ-ПЦР в реальном времени, Вестерн-блоттинг, тест Эймса для определения мутагенной активности полученных соединений, определение аффинности новосинтезированных химических производных CpdA к глюкокортикоидному рецептору путем анализа изменения поляризации флуоресценции, методы работы с суспензионными культурами опухолевых клеток, трансдукцию клеток лентивирусными векторами, люциферазный репортерный анализ, анализ профилей экспрессии генов на микрочипах Illumina, а также моделирование перевиваемой лимфомы у экспериментальных мышей *in vivo*.

Глава «Результаты» включает 3 раздела.

Первый раздел посвящен изучению GR-зависимого противоопухолевого эффекта селективного агониста GR CpdA *in vitro* и *in vivo*, как индивидуально, так и в комбинации с известными и потенциальными химиопрепаратами.

Во втором разделе описаны стратегии получения наночастиц золота из липопротеинов высокой плотности, в которые была произведена загрузка CpdA, а также энантиомеров CpdA и его химических производных. Исследованы биологические свойства полученных соединений: показан GR-зависимый антипролиферативный и проапоптотический эффекты, продемонстрирован запуск транс-репрессии и отсутствие индукции транс-активации, для наиболее эффективного в экспериментах *in vitro* соединения CpdA-03 показан противоопухолевый эффект *in vivo*.

Третий раздел посвящен подбору ингибиторов экспрессии GR-зависимого гена REDD1 с помощью биоинформатического скрининга баз данных, содержащих профили экспрессии генов в опухолевых клетках после воздействия лекарственных препаратов неонкологической направленности. Далее автором описаны серии экспериментов *in vitro*, в ходе которых для ряда потенциальных ингибиторов REDD1 эта способность была подтверждена и были отобраны наиболее эффективные ингибиторы. Более того, было показано, что использование

ингибиторов REDD1 совместно с глюкокортикоидами смещает их эффекты в сторону механизмов, наблюдаемых при запуске транс-репрессии. На моделях *in vivo* автору удалось продемонстрировать синергизм в противоопухолевом действии одного из наиболее перспективных ингибиторов REDD1 иммуносупрессора рапамицина и глюкокортикоида дексаметазона, и одновременное снижение степени GC-индуцированной атрофии кожного покрова, а также снижение экспрессии молекулярных маркеров остеопороза в костной ткани.

Несомненным достоинством работы Лесовой Е.А. является тщательность в проведении экспериментов и обработке результатов. Диссертационная работа выполнена на высоком теоретическом и методическом уровне, текст диссертации написан языком, легким для понимания биологами и медиками различных специализаций, результаты работы представлены в логичной форме. Объем исследований является достаточным для формулирования и обоснования представленных выводов.

Немногочисленные замечания в основном относятся к экспериментам на животных *in vivo*, носят дискуссионный характер и не снижают ценности и важности данной работы:

- При сравнительном анализе противоопухолевого эффекта CpdA и дексаметазона *in vivo* были использованы концентрации препаратов, отличающиеся в 5 раз (стр. 144, рис.17; стр.158 рис. 26), а в аналогичном эксперименте по сравнению противоопухолевого эффекта CpdA, CpdA-03 и дексаметазона (стр. 189-190, рис.46) в 7,5 раз (при этом в экспериментах *in vitro* концентрации были одинаковыми). Чем объясняется выбор таких концентраций препаратов *in vivo*?

- На этих же рисунках приведен только финальный размер экспериментальных опухолей, хотя кривые динамики роста опухолей были бы более информативны.

- Не везде указано количество животных в экспериментальных группах.

- В подписи к рисункам иногда упоминается окрашивание на TUNEL и Casp3, а показано окрашивание на CD31 (Рис. 17, 26), указано в подписи окрашивание на TUNEL, но на рисунке такой панели нет (Рис. 57);

- На рисунках не везде помечены панели, указанные в подписи (Рис. 17,26,57,61).

Глава «Обсуждение» демонстрирует широкий кругозор автора и его способность сопоставить собственные данные с результатами других исследователей. В представленной диссертационной работе автором впервые проведен анализ молекулярных механизмов действия глюкокортикоидного рецептора и возможностей использования селективного модулирования функциональной активности рецептора для оптимизации химиотерапии злокачественных новообразований с использованием селективных агонистов глюкокортикоидного рецептора или таргетного подавления экспрессии генов, обуславливающих развитие побочных эффектов глюкокортикоидов.

Работа завершается заключением и выводами, отражающими полученные в ходе исследования результаты и описывающими их научную значимость. Автореферат по содержанию полностью соответствует тексту диссертации. В целом, автором получены новые и интересные результаты, позволяющие и далее развивать это важное научное направление исследований.

### **Заключение**

Диссертационная работа Лесовой Екатерины Андреевны «Модулирование активации глюкокортикоидного рецептора в химиотерапии гемобластозов» является законченным, высококвалифицированным и современным исследованием, имеющим важное значение как для фундаментальной онкологии, так и для клинической практики. Результаты проведенного исследования расширяют представления о молекулярных механизмах действия GR и имеют важное практическое значение для всех патологий, при которых используются глюкокортикоидные препараты.

По своей актуальности, новизне, теоретической и практической значимости, обоснованности научных положений и выводов, полноте публикации материалов в научных печатных изданиях, диссертационная работа полностью соответствует критериям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней» (постановление Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года №842, в редакциях от 21 апреля 2016 года №335, от 02 августа 2016 года №748, от 29 мая 2017 года №650, от 28 августа 2017 года №1024 и от 01 октября 2018 года №1168), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а ее

автор Лесовая Екатерина Андреевна заслуживает присуждения ученой степени  
доктора биологических наук по специальности 14.01.12- онкология.

Официальный оппонент  
Доктор биологических наук  
ведущий научный сотрудник  
исполняющий обязанности  
руководителя лаборатории  
гликобиологии  
ФГБНУ «ФИЦ ФТМ»

Григорьева Эльвира Витальевна

Подпись доктора биологических наук Григорьевой Эльвиры Витальевны  
«Заверяю»

Ученый секретарь  
ФИЦ ФТМ  
доктор биологических наук

Пальчикова Наталья Александровна



Григорьевой Э.А.  
Пальчиковой Н.А.  
Заверяю  
Начальник отдела кадров  
26 09 2019 г.

Адрес:  
630117, г. Новосибирск, у. Тимакова 2,  
ФИЦ ФТМ,  
+7 (383) 333-65-37  
E-mail:director@centercem.ru  
WWW:https://frcftm.ru

27.09.2019