

ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени
кандидата биологических наук Первушина Николая Викторовича
на тему: «Механизмы приобретенной устойчивости опухолевых клеток к антагонистам
Mcl-1 и MDM2 и способы ее преодоления»
по специальностям 1.5.22 Клеточная биология, 1.5.4 Биохимия

Актуальность темы исследования. Диссертационная работа Первушина Николая Викторовича посвящена изучению механизмов приобретенной устойчивости опухолевых клеток к антагонистам Mcl-1 и MDM2 и способов ее преодоления. В ходе канцерогенеза опухолевые клетки приобретают ряд адаптационных преимуществ, к которым, в том числе, относится устойчивость к различным типам программируемой клеточной гибели, включая апоптоз, играющий важную роль в противоопухолевой защите организма. Целевой запуск апоптоза в опухолевых клетках является перспективной стратегией в лечении онкологических заболеваний. Регуляция апоптоза осуществляется различными генами и их продуктами, среди которых особое значение имеют белки семейства Bcl-2. Повышенное содержание антиапоптотических белков этого семейства (например, Mcl-1) является распространенным механизмом устойчивости опухолевых клеток к запуску апоптоза. Другим важным регулятором данного типа гибели является транскрипционный фактор p53, который поддерживает стабильность генома и препятствует образованию опухолей. Ингибирование антиапоптотического белка Mcl-1 и активация p53 за счет блокирования его негативного регулятора MDM2 при помощи селективных антагонистов этих белков являются привлекательными подходами в терапии онкологических заболеваний. Существенной проблемой при использовании различных противоопухолевых агентов становится развитие приобретенной лекарственной устойчивости к ним, что приводит к потере эффективности данных препаратов. В настоящее время ингибиторы Mcl-1 и MDM2 активно изучаются в клинических испытаниях, однако механизмы приобретенной устойчивости к данным препаратам и подходы по ее преодолению остаются малоизученными.

Обоснование темы и задач работы логично и не вызывает сомнений, а работа является актуальной и имеет как фундаментальное, так и прикладное значение.

Автор комплексно подошел к решению поставленных задач настоящей работы, используя разнообразные современные подходы клеточной и молекулярной биологии и биохимии и хорошо зарекомендовавшие себя методы статистического анализа.

Научная новизна исследования и полученных результатов. В ходе исследований было обнаружено, что белок Bax является важным маркером, определяющим чувствительность опухолевых клеток к действию антагонистов Mcl-1. Было выявлено, что в двух из трех новых клеточных моделях, характеризующихся устойчивостью к действию антагонистов Mcl-1, наблюдалось повышение уровней других антиапоптотических белков – Bcl-2 или Bcl-xL, что свидетельствует о роли этих белков в качестве предикторов ответа опухолевых клеток к ингибированию Mcl-1. При этом совместное подавление Mcl-1/Bcl-2 или Mcl-1/Bcl-xL вело к преодолению устойчивости опухолевых клеток к действию антагонистов Mcl-1. Кроме того, было показано, что наибольшая выживаемость у пациентов с аденокарциномой легкого наблюдалась при пониженных уровнях Bcl-xL и Mcl-1 вкуче с повышенным уровнем Bax.

Впервые был показан синергетический эффект при совместном использовании антагонистов Mcl-1 и MDM2 в модели нейробластомы. Также была получена новая клеточная модель нейробластомы, характеризующаяся повышенной резистентностью к действию антагонистов MDM2. Различными методами *in vitro* и *in silico* было определено, что причина устойчивости клеток нейробластомы к ингибированию MDM2 заключается в появлении мутаций в структуре p53. Показано, что химиопрепарат Цисплатин или антагонист Mcl-1 S63845 в сочетании с антагонистом MDM2 RG7388 вели только к частичному преодолению устойчивости опухолевых клеток к действию RG7388. Более того, на примере другого химиопрепарата – Доксорубицина – была продемонстрирована низкая эффективность химиопрепаратов-цитостатиков при развитии резистентности к ингибированию MDM2 в мышинной ксенографтной модели *in vivo*. Наконец, было обнаружено наличие биологической активности у новых ингибиторов MDM2, которые являются модификациями препарата Нутлин-3а и обладают по сравнению с ним улучшенными физико-химическими свойствами. Суммарно, полученные данные вносят существенный вклад в понимание механизмов приобретенной лекарственной устойчивости исследуемых препаратов целевого действия – антагонистов Mcl-1 и MDM2.

Теоретическое и практическое значение работы. Полученные результаты о маркерах, определяющих чувствительность опухолевых клеток к ингибированию Mcl-1, а также *in vitro*, *in silico* и *in vivo* данные, посвященные изучению механизмов приобретенной устойчивости к действию ингибиторов Mcl-1 и MDM2, имеют большое значение для развития современных стратегий лечения онкологических заболеваний. Так, например, эти сведения позволяют оценить потенциальные преимущества и недостатки использования селективных ингибиторов Mcl-1 и MDM2, а также могут способствовать их одобрению и рациональному применению на пациентах. Прогностическое значение профиля экспрессии белков семейства Bcl-2 у пациентов с аденокарциномой легкого крайне важно для развития подходов персонализированной медицины. Наконец, наличие биологической активности у новых ингибиторов MDM2, являющихся модификациями Нутлина-3а и обладающих повышенной растворимостью по сравнению с оригинальными соединениями из семейства нутлинов, важно для оптимизации подходов получения водорастворимых лекарственных препаратов.

Обоснованность и достоверность полученных результатов. Работа выполнена на высоком научно-методическом уровне. Научные положения, сформулированные автором в диссертации, основаны на изучении достаточного объема экспериментального материала, проведении статистического анализа полученных данных и публикации основных положений диссертации в научных журналах. Достоверность результатов подтверждается их воспроизводимостью в повторных экспериментах, наличием соответствующих контролей. Для решения поставленных задач были использованы современные подходы клеточной и молекулярной биологии и биохимии, а также классические методы статистического анализа. Научные положения и выводы аргументированы и базируются на согласованных данных теоретических и экспериментальных исследований. По материалам диссертации опубликовано 11 статей в рецензируемых международных и отечественных научных журналах. Результаты работы представлены на десяти конференциях и отражены в двух патентах.

Объем и содержание работы. Диссертация изложена на 191 странице машинописного текста и включает в себя введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, результаты и их обсуждение, выводы, список публикаций соискателя и список

литературы, содержащий 279 источников, из которых 275 зарубежных и 4 отечественных. Работа иллюстрирована 49 рисунками и 1 таблицей.

Во введении автор обосновывает актуальность исследования, освещает степень разработанности и научную новизну темы диссертационной работы. Автором корректно сформулированы цель и задачи исследования, а также положения, выносимые на защиту. Данный раздел диссертационного исследования находится в соответствии с выводами работы, сформулированными на основе полученных автором результатов.

Обзор литературы подробно описывает различные формы программируемой клеточной гибели, и затем переходит к описанию механизмов апоптоза. В следующем разделе описываются группы белков семейства Bcl-2 – проапоптотические белки, антиапоптотические белки, и проапоптотические BHL-1-only белки, их роль в запуске митохондриального апоптоза, их регуляция и изменения в опухолях. Затем автор описывает подходы к ингибированию проапоптотических белков с помощью таргетной терапии, особенно фокусируясь на белке Mcl-1 и его ингибиторах. В последнем разделе рассматривается роль p53 в канцерогенезе и ингибиторов его взаимодействия с MDM2. Представленный в литературном обзоре подробный анализ литературных источников указывает на тщательную проработку автором опубликованных данных. Обзор написан хорошим литературным языком и отлично проиллюстрирован.

В главе «Материалы и методы» подробно описаны все этапы выполнения работы, с применением современных методов молекулярной и клеточной биологии, биохимии и биоинформатики. Автор очень подробно описывает используемые материалы, что позволяет точно воспроизвести полученные данные. Применяемые методы показывают очень высокий уровень работы. Методы, использованные в работе, являются адекватными поставленным задачам и соответствуют цели работы.

Глава «Результаты» начинается с исследования активности антагонистов Mcl-1 на нескольких клеточных культурах. Затем анализируется влияние других белков семейства Bcl-2 на эффективность действия этих ингибиторов. Автор получил несколько устойчивых линий, и показал, что их устойчивость связана с увеличенной экспрессией генов белков Bcl-xL или Bcl-2 в этих клеточных линиях. Затем автор использует таргетные ингибиторы Bcl-2 и Bcl-xL, показывая, что они могут преодолевать выработанную устойчивость к ингибиторам Mcl-1. Автор проанализировал экспрессию генов про- и антиапоптотических белков в образцах аденокарциномы легкого, а также по данным базы данных TCGA. Контринтуитивно оказалось, что уровень антиапоптотических белков ниже в опухолевых тканях, а уровень проапоптотических белков увеличен. Однако прогноз выживаемости для пациентов с низкими уровнями Mcl-1 и Bcl-xL совместно с высоким уровнем Bax был значительно выше, чем у пациентов с другим профилем этих белков. Ранее в литературе было показано синергия ингибитора MDM2 и ингибитора Bcl-2. Автор показал синергетическое действие совместного ингибирования MDM2 и Mcl-1 в двух клеточных линиях нейробластомы. Было показано увеличение активности ингибитора MDM2 при совместном использовании с ингибитором Mcl-1 в обеих линиях методами иммуноблоттинга и проточной цитометрии subG1. Также была получена линия нейробластомы SH-SY5Y, устойчивая к ингибитору MDM2. Было показано, что такая устойчивость происходит из-за точечной мутации в p53, снижающей его транскрипционную активность. Было проведено молекулярное моделирование обнаруженной мутации His193Arg и показано, что она дестабилизирует тетрамерный комплекс p53-ДНК. Было подтверждено существование такой мутации в образцах тканей пациентов. Ингибитор

Mcl-1 частично возвращал чувствительность клеток нейробластомы к ингибитору MDM2, но не полностью преодолевал эту устойчивость. Такой же эффект был показан для химиотерапевтического препарата цисплатина, при этом его собственная противоопухолевая активность была снижена в устойчивой линии. Затем автор показал, что чувствительность резистентных к ингибитору MDM2 клеток SH-SY5Y к химиопрепарату доксорубину также значительно снижена *in vivo*, в модели ксенографта. Таким образом, приобретенная устойчивость к ингибированию MDM2 сопровождается снижением чувствительности к действию ДНК-повреждающих агентов. Кроме того, автором было установлено, что устойчивые клетки нейробластомы отличались повышенной пролиферативной активностью в купе с более интенсивным метаболизмом по сравнению с материнской популяцией клеток.

В последней части работы оценивались новые ингибиторы взаимодействия MDM2-p53. Было установлено, что вещества-лидеры способны к эффективному ингибированию MDM2 и сопоставимы в наномолярных концентрациях по эффективности действия с Нутлином-3а.

В главе «Обсуждение» достаточно подробно и обстоятельно проанализированы полученные результаты, что не оставляет сомнений в новизне полученных данных и содержит перспективы к дальнейшему продолжению исследований.

Заключение и выводы сформулированы грамотно, соответствуют положениям, выносимым на защиту, отражают ключевые результаты и полностью отвечают поставленным задачам и цели.

Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации/Общая оценка работы. Диссертация выполнена на очень высоком уровне. Отдельные опечатки и небрежности встречаются очень редко, и не снижают высокой оценки представленной работы и ее научной и научно-практической значимости. По результатам диссертации есть несколько вопросов, которые были бы интересны для дискуссии.

Вопросы и замечания

- 1) Чем обусловлен выбор гистологического происхождения клеточных линий и материала пациентов, используемых в работе? Предполагается ли, что аденокарцинома легкого будет более чувствительна к ингибиторам Mcl-1, чем другие опухоли, по данным профилирования белков семейства Bcl-2?
- 2) Автор показывает, что преодоление устойчивости к ингибиторам Mcl-1 возможно с использованием ингибиторов Bcl-xL, однако они обладают высокой токсичностью по отношению к тромбоцитам. Также многие нормальные клетки могут быть чувствительны к такой комбинации. Есть ли подходы, позволяющие снизить такую токсичность? Возможно ли применение других подходов, предотвращающих увеличение экспрессии Bcl-xL?
- 3) Каков предположительный механизм увеличения экспрессии Bcl-2 и Bcl-xL в устойчивых линиях? Возможно ли воздействие на этот механизм для предотвращения возникновения такой устойчивости?

Заключение

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация Первушина Николая Викторовича на тему «Механизмы приобретенной устойчивости опухолевых клеток к антагонистам Mcl-1 и MDM2 и способы ее преодоления» отвечает требованиям, установленным Московским государственным

университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальностям 1.5.22 Клеточная биология, 1.5.4 Биохимия (по биологическим наукам). Диссертация Первушина Н.В. отвечает критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова, а также оформлена согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Таким образом, соискатель Первушин Николай Викторович заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.22 Клеточная биология, 1.5.4 Биохимия.

Официальный оппонент:

кандидат биологических наук,

с.н.с., заведующий лабораторией молекулярной онкобиологии
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Институт биологии гена Российской академии наук (ИБГ РАН)

Татарский Виктор Вячеславович

23.01.2025

Контактные данные:

тел.: +79165535786, e-mail: tatarskii@gmail.com

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация:

14.01.12 Онкология

Адрес места работы:

119334, г. Москва, ул. Вавилова, д. 34/5

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биологии гена Российской академии наук (ИБГ РАН)

тел.: +7(499)135-60-89, e-mail: tatarskii@gmail.com

Подпись Татарского В.В. заверяю

Ученый секретарь Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Институт биологии гена Российской академии наук, доктор биологических наук.

Набирочкина Елена Николаевна

