

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Вевнорского Александра Петровича «Поиск биомаркеров чувствительности опухолевых клеток к лучевой и таргетной терапии онкологических заболеваний на основе данных об их молекулярной гетерогенности и эффективности репарации ДНК», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.1. – Радиобиология

Актуальность избранной темы

Значительный рост заболеваемости злокачественными новообразованиями в Российской Федерации (более 600 000 случаев ежегодно) и потенциал лучевой терапии для значительной части пациентов создают острую необходимость в развитии высокотехнологичных производств данного метода лечения. Радиорезистентность опухолей существенно ограничивает эффективность лучевой терапии, являющейся ключевым методом онкологического лечения. Следовательно, изучение молекулярных механизмов, определяющих выживаемость опухолевых клеток после воздействия ионизирующего излучения, является наиболее приоритетным направлением исследований. Для разработки эффективных стратегий противораковой терапии, особенно важны исследования, направленные на понимание механизмов репарации ДНК и клеточной гибели, индуцируемых лечением. Диссертационная работа Вевнорского А.П. посвящена актуальной проблеме современной онкологии и радиобиологии – поиску биомаркеров радиочувствительности и радиорезистентности опухолевых клеток на основе анализа молекулярной гетерогенности и механизмов репарации ДНК.

Хорошо известно, что лучевая терапия применяется у более 50% онкологических пациентов, но ограничена радиорезистентностью и побочными эффектами. Автор правильно подчеркивает роль дефектов репарации ДНК в онкогенезе и потенциал синтетической летальности для таргетной терапии, ссылаясь на ключевые работы. Основной фокус работы –

интеграция мультиомиксных подходов, *in silico* и *in vitro* экспериментов для идентификации потенциальных терапевтических мишеней и модуляторов репарации ДНК, включая концепцию синтетической летальности. Тема соответствует паспорту специальности 1.5.1. Радиобиология, поскольку напрямую касается молекулярных механизмов радиационного повреждения и репарации ДНК в контексте онкологических заболеваний. Цель диссертационной работы А.П. Вевиорского, сформулированная как разработка интегрированного подхода для выявления биомаркеров чувствительности опухолевых клеток к лучевой и таргетной терапии, а также идентификации перспективных терапевтических мишеней на основе изучения молекулярной гетерогенности опухолей и механизмов репарации ДНК., безусловно, является актуальной современной задачей.

Научная новизна исследований и полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. Научная новизна работы заключается в разработке интегрированного подхода для поиска биомаркеров на основе сравнения профилей генной экспрессии после облучения и воздействия веществ из библиотеки СМАР, а также в идентификации новых модуляторов репарации ДНК (например, связанных с DYRK2). Впервые диссертантом установлена роль гена CEP135 как прогностического биомаркера для стратификации пациентов с саркомой. Показано, что его высокая экспрессия коррелирует с неблагоприятным прогнозом, а связанная с ним активация сигнального пути PLK1/G2-M открывает новые возможности для таргетной терапии. В работе предложена новая терапевтическая мишень для лечения пациентов с колоректальной карциномой, у которых нарушены функции генов PARP3 и MLH1 – ген NDRG1.

Особого внимания заслуживает разработанный диссертантом алгоритм поиска низкомолекулярных модуляторов репарации ДНК.

В целом, полученные результаты характеризуются значительной научной новизной, представляют не только теоретический, но и практический интерес для дальнейшего развития радиационной биологии и онкологии.

Практическая ценность работы

Практическая значимость исследования заключается в том, что предложенные биомаркеры могут способствовать персонализации терапии, особенно для глиом и глиобластом. Особый интерес представляет внедрение в клиническую практику биомаркера CEP135, что позволит проводить предварительную стратификацию пациентов с саркомой и выделять подгруппу, наиболее чувствительную к терапии, направленной на ингибирование PLK1, что может повысить эффективность лечения.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации и их достоверность

Научные положения и выводы диссертационной работы Вевиорского А.П. основаны на обширном экспериментальном материале, поэтому являются обоснованными и достоверными. Результаты работы отражены в солидных научных публикациях. Они также были неоднократно представлены на российских и международных конференциях. Важно подчеркнуть, что диссертация выполнена на современном методическом уровне, соответствующем мировым стандартам. Суть этих стандартов сводится к тому, что любые радиобиологические, генетические работы должны сопровождаться анализом механизмов на молекулярном уровне. В работе использованы такие надежные методы, как биоинформатический анализ данных из TCGA, GEO и ArrayExpress, который сочетается с *in vitro* экспериментами на клеточных линиях. Положительно можно отметить использование алгоритмов для анализа дифференциальной экспрессии (limma), обогащения путей (Reactome) и стратификации пациентов (Каплан-Майер с log-rank тестом). *In vitro* часть включает стандартные методы (анализ выживаемости клеток, иммунопреципитация, иммуноблоттинг), что

обеспечивает воспроизводимость. Поэтому надежность полученного экспериментального материала не вызывает сомнений.

Подтверждения опубликованных основных результатов диссертации в научной печати. По материалам диссертации автором опубликовано 8 печатных работ, в том числе 4 статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для защиты в МГУ имени М.В.Ломоносова.

Оценка содержания диссертации, её завершенность в целом, замечания по оформлению

Диссертационная работа написана по традиционному плану и включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, описание результатов исследования с их обсуждением, заключение, выводы, список литературы, состоящий из 209 источников. Текст диссертации изложен на 129 страницах машинописного текста и включает 13 рисунков.

Во введении автором обоснована актуальность темы исследования, раскрыта степень разработанности темы, сформулированы цель и задачи исследования, определены научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, а также положения, выносимые на защиту, описаны методология и методы исследования, степень достоверности полученных результатов. Обзор литературы занимает 24 стр. и представлен шестью разделами. Первый из них посвящен описанию роли лучевой терапии при лечении злокачественных новообразований. Во втором разделе обзора автор приводит данные литературы, касающиеся молекулярных механизмов радиорезистентности опухолей. В третьем разделе подробно рассматривается роль процессов восстановления в развитии онкогенеза и поиску возможных биомаркеров для стратификации пациентов. В четвертом разделе рассматриваются современные мультиомиксные подходы в онкологии. Пятый и шестой разделы посвящены таргетной терапии. Обзор написан хорошим литературным языком, легко читается, включает современные сведения по изучаемым вопросам и вводит читателя в область анализируемых автором проблем.

Материалы и методы исследования подробно изложены в главе 2, которая дает полную информацию о спектре использованных методик и объеме проведенной работы. В данном разделе детально описаны методы биоинформатической обработки данных, а именно обработаны данные транскриптомного анализа, фенотипах, выживаемости, вариациях числа копий генов (CNV) и точечных мутациях пациентов с различными типами опухолей из базы данных TCGA (UCSC Xena), а также экспрессионные данные пациентов с редкими наследственными заболеваниями, связанными с дефектами репарации в ДНК и повышенным риском развития онкологических заболеваний, из репозитория GEO и ArrayExpress. Для выявления потенциальных терапевтических мишеней был использован интегративный биоинформатический подход, объединяющий омиксные и текстовые данные.

Также представлены методы экспериментальной части работы, выполненной на пяти клеточных линиях: U2OS, MCF-7, L56BRC1, HCT116 и HCT116+Cr3.

В главе 3 представлены собственные результаты исследования, которые разделены на 3 основных блока:

В первой части рассматривается анализ вариабельности результатов лучевой терапии, с акцентом на сравнение глиомы низкой степени злокачественности и глиобластомы.

Для этого были построены кривые Каплана–Майера и проведен сравнительный анализ общей выживаемости пациентов, получавших и не получавших лучевую терапию, с использованием log-rank теста. Показано, что пациенты с глиобластомой, получавшие лучевую терапию, демонстрируют улучшение выживаемости, тогда как для пациентов с глиомой низкой степени злокачественности наблюдается противоположная тенденция. Примененный диссертантом подход позволил выявить различия в регуляции процессов репарации ДНК и иммунного ответа: у пациентов с глиомой низкой степени злокачественности, прошедших лучевую терапию, отмечалась тенденция к активации путей репарации ДНК и снижению активности интерферонового

сигналинга, что может способствовать формированию радиорезистентности. Также в ходе выполнения диссертационного исследования было показано, что мутации в гене ATRX ассоциированы с повышенной чувствительностью к лучевой терапии, тогда как амплификация гена EGFR связана с ухудшением прогноза выживаемости после облучения. Выявленные молекулярные особенности могут рассматриваться в качестве потенциальных биомаркеров радиочувствительности и радиорезистентности, что открывает возможности для более точной стратификации пациентов и персонализированного подбора терапии.

Второй раздел представляет подход к поиску низкомолекулярных соединений, способных модулировать процессы репарации ДНК, определение их мишеней и идентификации синтетически летальных пар генов для таргетной терапии. Для этого было проведено сравнение транскриптомных профилей клеток, подвергшихся воздействию фотонного излучения высокой мощности, и транскриптомных профилей клеток, которые инкубировали с различными низкомолекулярными соединениями. В результате этого анализа для дальнейших исследований на клетках было выбрано низкомолекулярное соединений мепакрин. Экспериментальная проверка на клетках показала, что мепакрин модулирует процессы репарации ДНК и изменяет работы сигнальных путей, ответственных за восстановление поврежденной ДНК. Для поиска новых мишеней мепакрина был проведен генетический скрининг с использованием малых интерферирующих РНК, в результате была идентифицирована новая перспективная мишень для разработки новых противоопухолевых препаратов – белок NDRG1. Полученные результаты демонстрируют возможность использования низкомолекулярных модуляторов репарации ДНК в качестве инструментов для поиска новых терапевтических мишеней и биомаркеров чувствительности для разработки персонализированных подходов к лечению онкологических заболеваний.

В третьей части представлен подход к поиску биомаркеров и терапевтических мишеней на основе анализа экспрессионных профилей

редких наследственных заболеваний, связанных с нарушениями репарации ДНК и повышенным риском развития онкологических заболеваний. Для анализа были выбраны три заболевания: атаксия-телсангизектазия, синдром Неймегена и синдром Вернера. Сравнительный анализ транскриптомных профилей больных и здоровых образцов выявил гены, которые статистически достоверно либо повышены, либо понижены в фибробластах, полученных от пациентов с данными заболеваниями, а именно, ген CEP135 как один из наиболее статистически достоверно возмущенных генов, общий для этих заболеваний. Анализ показал, что уровень экспрессии CEP135 статистически достоверно коррелирует с выживаемостью пациентов с саркомой, что позволяет рассматривать его в качестве потенциального прогностического биомаркера. Стратификация пациентов с саркомой по молекулярным биомаркерам, таким как CEP135, может позволить индивидуализировать лечение и повысить его эффективность у пациентов с неблагоприятным прогнозом. Такой подход позволил выявить наиболее перспективные мишени для данной подгруппы пациентов, среди которых киназа PLK1 была предложена как наиболее перспективная терапевтическая мишень для пациентов с саркомой и высоким уровнем экспрессии CEP135.

Все опубликованные в диссертационной работе результаты сопоставлены с данными литературы. Представленный в этой главе анализ показывает глубокое знание автором теоретических вопросов по теме диссертационной работы.

В разделе «Заключение» кратко изложено основное содержание диссертационной работы, из которого логично вытекают выводы.

Представленный в диссертации материал научной работы соответствует цели и задачам исследования, выводы и рекомендации аргументировано отражают ее основные научные положения, являются обоснованными и логично вытекают из результатов исследований. Автореферат в полном объеме отражает основные результаты научного поиска.

При изучении работы Вевиорского А.П. принципиальных недочетов, снижающих ценность работы, не выявлено. В тексте присутствуют отдельные опечатки, неудачные речевые обороты.

В ходе ознакомления с работой возникли следующие замечания:

1. В обзоре литературы (глава 1) охвачены ключевые аспекты, но раздел 1.3 (генетические нарушения репарации ДНК) мог бы включать больше современных данных по CRISPR-скринингам или эпигенетическим модификациям (например, роль H3K27me3 в репарации). Ссылки преимущественно до 2020 г.; рекомендуется обновить список литературы свежими публикациями (2023–2025 гг.) из Nature Reviews Cancer или Cancer Cell.
2. Автор опирается на публичные базы данных (TCGA и др.), но не всегда указывает на потенциальные биасы, такие как неоднородность клинических образцов или ограничения ретроспективных данных. Например, в разделе 3.1 (анализ глиом и глиобластом) сравнение выживаемости пациентов после лучевой терапии основано на относительно небольшой выборке; рекомендуется обсудить влияние confounding factors (возраст, стадия заболевания, коморбидности), которые могли повлиять на результаты.
3. В анализе выживаемости и кластеризации используется log-rank тест, но отсутствует корректировка на множественные сравнения (например, Bonferroni или FDR). Это может привести к завышению значимости некоторых биомаркеров. Кроме того, в in silico анализе нокдауна генов (раздел 2.1) алгоритм ранжирования терапевтических мишеней описан схематично; желательно привести примеры кода или более детальное обоснование пороговых значений ($p\text{-value} < 0.05?$).

Также имеются вопросы, на которые хотелось бы получить ответы:

1. В методологии поиска модуляторов репарации ДНК (раздел 2.1) Вы используете библиотеку CMAP для сравнения профилей экспрессии. Обоснуйте выбор именно этой библиотеки по сравнению с более современными, такими как LINCS или PRISM, и укажите, как Вы

корректировали на потенциальные артефакты, связанные с дозами веществ в СМАР.

2. В главе 3.2 идентифицированы синтетически летальные пары генов, включая роль DYRK2. Почему в *in vitro* экспериментах (DARTS, иммуноблоттинг) не было проверено влияние ингибиторов DYRK2 на нормальные клетки, чтобы оценить терапевтическое окно и потенциальную токсичность?
3. Ваш алгоритм ранжирования терапевтических мишеней (раздел 2.1) основан на iPANDA и gseapy. Укажите, как Вы валидировали его предсказательную точность на независимых датасетах (не из TCGA), и почему не использовали машинное обучение (например, random forest) для улучшения стратификации пациентов?
4. В заключении Вы подчёркиваете практическую значимость для персонализированной терапии. Как предложенные биомаркеры могут быть интегрированы в клинические рекомендации (например, NCCN guidelines для глиобластом), и какие шаги планируете для их патентования или клинических испытаний?

Поставленные вопросы и замечания не снижают научной ценности диссертационной работы.

Заключение. Полученные автором данные дополняют научные сведения, имеющиеся в зарубежной и отечественной литературе. Работа методически выдержана, соответствует современным требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям. Основные научные результаты и рекомендации отражают содержание работы, характеризуются обоснованностью и репрезентативностью.

Диссертация «Поиск биомаркеров чувствительности опухолевых клеток к лучевой и таргетной терапии онкологических заболеваний на основе данных об их молекулярной гетерогенности и эффективности репарации ДНК» Вевиорского Александра Петровича отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к

работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 1.5.1. Радиобиология (по биологическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова. Диссертационное исследование оформлено согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Вевиорский Александр Петрович заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.1. Радиобиология.

Официальный оппонент:

Доктор биологических наук,
профессор отделения биотехнологий,
руководитель направлений подготовки
06.03.01, 06.04.01, 06.06.01 Биологические науки
Обнинского института атомной энергетики - филиала
Федерального государственного автономного
образовательного учреждения высшего образования
«Национальный исследовательский ядерный
университет «МИФИ»

КОМАРОВА Людмила Николаевна