ОТЗЫВ

официального оппонента доктора медицинских наук, профессора, члена-корреспондента РАН Кушлинского Николая Евгеньевича на диссертационную работу Черепанова Сергея Александровича «ВЛИЯНИЕ КОМПОНЕНТОВ СИГНАЛЬНОГО ПУТИ HEDGEHOG НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ И ХИМИОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ НИЗКОДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ ГЛИОМ», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – Биохимия

Актуальность темы. Мультиформная глиобластома занимает лидирующие позиции по показателям высокой смертности среди других злокачественных новообразований человека. Во многом, это связано с тем, что глиобластомы малочувствительны к известным методам лечения. Стандартная терапия, включающая хирургическую операцию, лучевую терапию, применение лекарственных препаратов темозоломида, стероидов, не приводит к увеличению показателей выживаемости больных, которая остается крайне низкой. К настоящему времени для лечения пациентов с глиобластомами нет целенаправленных таргетных препаратов против клеточных мишеней опухоли. Все это свидетельствует о необходимости поиска новых мишеней для лечения таких пациентов. Для решения этой проблемы одним из подходов может быть исследование новых сигнальных каскадов, активация которых ведет к неуправляемой клеточной пролиферации, сопровождающей рост опухоли. Одним из таких каскадов может быть сигнальный путь Hedgehog, регулирующий процессы эмбриогенеза у многих видов животных, активация которого показана для некоторых типов опухолей. Однако его роль в канцерогенезе клеток глии остается малоисследованной. Вместе с тем, именно в этом типе клеток происходит Hedgehog-зависимая активация транскрипционных факторов GLI1, гены-мишени которых регулируют пролиферацию, ангиогенез, клеточную миграцию и многие другие важные процессы выживания клетки. Автор ставит перед собой цель исследования: изучение влияния сигнального

пути Hedgehog на пролиферацию и химиорезистентность низкодифференцированных глиом на модели клеточных линий мультиформной глиобластомы человека U-251 MG и U-87 MG. В связи с вышесказанным, актуальность диссертационной работы Черепанова С.А., направленная на решение данных вопросов, не вызывает сомнения.

Научная новизна диссертационной работы Черепанова С.А. не вызывает сомнения. Автором предложен оригинальный метод измерения электрического импеданса для оценки влияния сигнального пути Hedgehog на пролиферацию клеток глиобластом человека U-87 MG и U-251 MG. Такой метод в сочетании с оценкой погибших и апоптотических клеток с помощью проточной цитометрии позволил оценить ингибирующее действие циклопамина ингибитора Hedgehog пути на пролиферацию клеток низкодифференцированных глиом. Автор показал, что ингибирование и стимулирование сигнального пути Hedgehog влияет на чувствительность клеток линии U-251 MG к исследуемым химиотерапевтическим препаратам. Диссертантом получены оригинальные результаты о том, что сигнальный путь Hedgehog влияет на мультилекарственную резистентность клеток опухолевых линий U-251 MG и U-87 MG.

Теоретическая и практическая значимость результатов диссертационного исследования. Проведенные в диссертационной работе Черепанова С.А. исследования представляют интерес для фундаментальной науки, так как расширяют наши представления о роли сигнального пути Hedgehog в канцерогенезе клеток глии, а полученные результаты направляют исследователей на адресное изучение этапов канцерогенеза. Результаты данной работы имеют также и прикладное значение, так как помогают оценить состояние сигнального пути Hedgehog в клеточных линиях глии и астроцитов человека, что может представлять потенциальный интерес для выявления мишеней таргетной терапии. Измерение электрического импеданса может быть использовано для оценки влияния других ингибиторов сигнального пути и оценки влияния сигнального пути Hedgehog на чувствительность клеток к

различным химиотерапевтическим препаратам. Такой подход будет способствовать подбору комбинаций ингибиторов сигнального пути Hedgehog и в будущем может быть основой для персонализированной терапии низкодифференцированных глиом.

Степень достоверности и обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. Основные результаты по исследованию влияния лиганда и ингибитора Hedgehog пути на пролиферацию клеток глиомы и астроцитов получены лично автором. Достоверность полученных в диссертационной работе результатов не вызывает сомнения. Все исследования проведены с привлечением современных экспериментальных методов биохимии и клеточной биологии высокого технологического уровня. Выводы диссертационной работы корректны и в полной мере отражают полученные результаты.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 123 машинописных страницах. Состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов, обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений и условных обозначений и списка литературы. Диссертация иллюстрирована 23 рисунками и 1 таблицей. Список литературы включает 271 источник, в том числе 5 отечественных и 266 зарубежных.

Во введении автор обосновывает актуальность выбранного исследования, на основании чего формулирует цель и задачи исследования, научную новизну, теоретическую и практическую значимость полученных результатов.

Обзор литературы состоит из шести подглав. Первая подглава посвящена классификации опухолей головного мозга и приведена оценка глиом по степеням злокачественности. Во второй подглаве представлены особенности функционирования сигнального пути Hedgehog в процессах клеточной трансформации, дана характеристика белков, вовлеченных в передачу клеточного сигнала. Автор указал также на другие возможности регулирования Hedgehog пути, что важно для понимания механизмов канцерогенеза. В третьей подглаве обзора представлены данные научной

литературы о заболеваниях, связанных с нарушениями сигнального пути Hedgehog. В четвертной подглаве представлен анализ особенностей функционирования сигнального пути Hedgehog при глиомах. В пятой подглаве представлены существующие на сегодняшний день возможности ингибирования и активации сигнального пути Hedgehog. Наконец, в шестой подглаве проведен анализ влияния сигнального пути Hedgehog на ключевые процессы онкогенеза.

В целом, диссертант достаточно глубоко проанализировал современные проблемы, касающиеся роли сигнального пути Hedgehog в канцерогенезе в целом, и канцерогенезе клеток глии, в частности.

Материалы и методы исследования адекватны поставленной цели и решаемым задачам. Исследования выполнены на клеточных культурах и образцах из опухолевых тканей человека. В работе использован необходимый набор современных методов биохимии, клеточной и молекулярной биологии. Автором разработан дизайн праймеров для определения экспрессии исследуемых генов Hedgehog пути с помощью ОТ-ПЦР в режиме реального времени. Для оценки жизнеспособности клеток были использованы флуоресцентные методы и проточная цитометрия. Анализ пролиферации и жизнеспособности клеток проводился с использованием технологии измерения электрического импеданса на клеточном анализаторе xCELLigence System (Roche Diagnostics). Для статистического анализа использовали оценку нормальности распределения, параметрические и непараметрические критерии, коэффициент корреляции Спирмена r, выбранный уровень значимости $p<0,05$.

В главе «Результаты» представлены результаты собственных исследований, последовательно приводятся этапы проведения экспериментов. Полученные данные исследования убедительно показали, что ген *tGLI1* экспрессируется только в клетках линии глиомы человека U-87 MG и не экспрессируется в клетках глиомы линии U-251 MG, клетках астроцитов человека и первичных послеоперационных образцах глиом. Уровень

экспрессии *tGLI1* в клетках U-87 MG крайне низкий, что сделало затруднительным его определение при исследовании процессов пролиферации и химиорезистентности. Также показано, что уровень экспрессии *GLI1* в клетках линий U-251 MG и U-87 MG достоверно превышает таковой в клетках культуры астроцитов человека. Экспрессия *GLI1* в первичных образцах глиом 3 и 4 степени злокачественности (25 образцов) не превышает экспрессию *GLI1* в образцах здоровой ткани мозга, что не позволяет судить о влиянии сигнального пути на процессы пролиферации и химиорезистентности только по ПЦР в реальном времени. Результаты также показали, что активатор сигнального пути Hedgehog лиганд Shh стимулирует пролиферацию клеток линии U-251 MG и астроцитов человека, но не оказывает влияния на пролиферацию клеток линии U-87 MG. Ингибитор сигнального пути Hedgehog циклопамин уменьшает клеточную пролиферацию линий глиомы U-251 MG и U-87 MG, но не влияет на пролиферацию клеток культуры астроцитов человека. Циклопамин в концентрациях 5 и 10 мкМ не оказывает прямого цитотоксического действия на клетки линий глиом и культуры астроциты человека, но оказывает Hedgehog сигналинг-опосредованное цитотоксическое действие на клетки линий глиом.

Качественная оценка активности сигнального пути Hedgehog в клетках линий глиом и клетках культуры астроцитов человека позволяет продемонстрировать активацию сигнального пути в клетках линий глиом и неактивное состояние в клетках культуры астроцитов человека.

Показано также, что сигнальный путь Hedgehog влияет на химиорезистентность. Культивирование клеток глиомы линии U-251 MG с циклопамином приводит к сокращению срока начала гибели клеток после внесения цисплатина, темозоломида и доксорубицина. Культивирование клеток глиомы линии U-251 MG с лигандом Shh приводит к увеличению срока начала гибели клеток после внесения цисплатина и доксорубицина и не влияет на этот показатель при инкубации с темозоломидом. Культивирование клеток

культуры астроцитов человека с циклопамином и лигандом Shh не оказывало влияния на время начала гибели клеток при внесении исследуемых химиотерапевтических препаратов. В итоге автор делает вывод о том, что сигнальный путь Hedgehog принимает участие в формировании фенотипа клеток боковой популяции линий глиомы U-251 MG и U-87 MG.

В главе «Обсуждение» подробно и убедительно обсуждены основные положения представленного исследования.

Выводов 6, все они соответствуют цели и задачам проведенного исследования.

Следует отметить, что несмотря на высокое качество работы, есть замечание. В обзоре литературы подглава 6 «Влияние сигнального пути Hedgehog на ключевые процессы онкогенеза» нелогично вставлена в конец обзора, особенно после подглавы 5, посвященной ингибиторам и индукторам этого пути. Целесообразно было бы сделать ее подглавой 2, например. Принципиального характера это замечание не имеет и не снижает общей высокой оценки работы.

Автореферат оформлен согласно рекомендациям ВАК, в котором отражены ключевые положения диссертационной работы.

Материалы диссертационного исследования доложены и обсуждены на российских и международных конференциях. По результатам диссертации опубликовано 10 печатных работ, в том числе 6 статей в ведущих российских рецензируемых журналах и 4 тезиса докладов.

Заключение. Диссертационная работа Черепанова Сергея Александровича на тему «ВЛИЯНИЕ КОМПОНЕНТОВ СИГНАЛЬНОГО ПУТИ HEDGEHOG НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ И ХИМИОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ НИЗКОДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ ГЛИОМ» является законченной научно-квалификационной работой, выполненной под руководством доктора медицинских наук, профессора Чехонина Владимира Павловича, содержащей новое решение актуальной научной задачи по оценке влияния сигнального пути Hedgehog на пролиферацию и химиорезистентность клеток

низкодифференцированных глиом, имеющей существенное значение для биохимии.

Диссертационная работа Черепанова Сергея Александровича соответствует требованиям п.9 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г. (с изменениями в редакции постановлений Правительства РФ №335 от 21.04.2016 г. и № 748 от 02.08.2016 г.), а ее автор Черепанов Сергей Александрович заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – «Биохимия».

Официальный оппонент:
доктор медицинских наук (14.01.12 - Онкология), профессор,
член-корреспондент РАН, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Министерства Здравоохранения Российской Федерации, Научно-исследовательский институт клинической онкологии им. Н.Н. Трапезникова,
лаборатория клинической биохимии,
заведующий Н.Е. Кушлинский

«5» 06 2019 г.

Кушлинский Николай Евгеньевич
почтовый адрес: 115478, г. Москва, Каширское шоссе 24
организация: ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России
моб. тел. +7(903)239-25-69, e-mail: biochimia@yandex.ru; 8(499)324-11-79

Подпись д.м.н., профессора,
члена-корреспондента РАН Н.Е. Кушлинского заверяю:
Ученый секретарь ФГБУ «НМИЦ онкологии
им. Н.Н. Блохина» Минздрава России
к.м.н. И.Ю. Кубасова