



**МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО
ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(МИНОБРНАУКИ РОССИИ)**

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук
(ИБХ РАН)**

ул. Миклухо-Маклая, 16/10, ГСП-7, Москва, 117997. Для телеграмм: Москва В-437, Биоорганика
телефон: (495) 335-01-00 (канц.), факс: (495) 335-08-12, E-mail: office@ibch.ru, www.ibch.ru
ОКПО 02699487 ОГРН 1037739009110 ИНН/КПП 7728045419/772801001

21.05.2019 № 100-217.1-442

на № _____ от _____

«УТВЕРЖДАЮ»:

директор ИБХ РАН

д.х.н., профессор, академик РАН

Габибов Александр Габибович

21 мая 2019 г.

Отзыв ведущей организации

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 исследования

Диссертационная работа Черепанова Сергея Александровича посвящена изучению влияния компонентов сигнального пути Hedgehog на пролиферацию и химиорезистентность низкодифференцированных глиом. Мультиформная глиобластома – самая злокачественная из первичных нейроэпителиальных опухолей головного мозга. Средняя продолжительность жизни после постановки диагноза не превышает 12 – 15 месяцев. Существующие методы терапии, такие как резекция опухоли, радиотерапия и химиотерапия малоэффективны. Для создания более специфичных методов терапии требуется ясное понимание частных механизмов онкогенеза и поиск конкретных мишеней среди белков сигнальных путей, принимающих участие в возникновении и развитии опухоли.

Все больше появляется исследований, акцентирующих внимание на возможном вовлечении в онкогенез вообще и в глиомогенез в частности сигнального пути Hedgehog, влияющего на пролиферативную, миграционную и инвазивную активность, ангиогенез, нарушение клеточного метаболизма, антигенную мимикрию и другие клеточные процессы. До сих пор окончательно не ясна роль некоторых основных компонентов сигнального пути Hedgehog. В процессе исследования обнаруживают новые изоформы компонентов Hedgehog пути, которые присутствуют не во всех опухолевых клетках и не при всех опухолевых заболеваниях. Все эти факторы указывают на многообразие уровней функционирования сигнального пути и сложность его изучения.

Тема оценки активности сигнального пути Hedgehog не до конца проработана. Поэтому необходима разработка критериев, по которым можно было бы оценить активность Hedgehog пути. А изучение влияния сигнального пути на те или иные клеточные процессы, в первую очередь на пролиферативную активность и химиорезистентность, позволит оптимально подбирать соответствующую терапию.

Автором были сформулированы следующие задачи данной диссертационной работы:

1. Оценить экспрессию генов транскрипционных факторов GLI1 и tGLI1 в клетках глиом человека линий U-251 MG, U-87 MG, клетках культуры астроцитов человека, в первичных послеоперационных образцах глиом и образцах здоровой ткани мозга. Оценить возможности ПЦР в реальном времени для потенциального анализа влияния транскрипционных факторов GLI1 и tGLI1 на процессы пролиферации и химиорезистентности.
2. Оценить влияние Shh и циклопамина на пролиферацию клеток глиом человека линий U251 MG, U-87 MG и клеток культуры астроцитов человека.
3. Оценить цитотоксическое действие циклопамина на клетки глиом человека линий U251 MG, U-87 MG и на клетки культуры астроцитов человека.
4. Качественно оценить активность сигнального пути Hedgehog в клетках глиом человека линий U-251 MG, U-87 MG и в клетках культуры астроцитов человека.
5. Оценить влияние Shh и циклопамина на химиорезистентность клеток к цисплатину, темозоломиду и доксорубину.
6. Оценить влияние сигнального пути Hedgehog на формирование фенотипа клеток боковой популяции.

Из сказанного следует, что автор комплексно подошел к решению главной проблемы, а именно выяснению роли сигнального пути Hedgehog и его компонентов в развитие опухолевой трансформации. Приведенные формулировки показывает, что автор подходит к проблеме как с позиций фундаментальной науки, так и с позиций

трансляционной медицины.

Объем и содержание работы

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.

Связь с планами соответствующих отраслей науки

Диссертационная работа Черепанова Сергея Александровича выполнялась в соответствии с основными направлениями программы научных исследований Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И.Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научная новизна исследования, полученных результатов и выводов

Для оценки влияния сигнального пути Hedgehog на пролиферацию клеток глиобластом человека был использован метод измерения электрического импеданса. Предложенное сочетание применения методов измерения электрического импеданса и анализа процента погибших и апоптотических клеток с помощью проточной цитофлуориметрии позволило дифференцировать Hedgehog сигналинг-опосредованное цитотоксическое действие ингибитора сигнального пути циклопамина и его действие на пролиферацию клеток низкодифференцированных глиом. Полученные данные были применены для качественной оценки активности сигнального пути. Было показано, что сигнальный путь Hedgehog влияет на чувствительность клеток линии U-251 MG к исследуемым химиотерапевтическим препаратам, а также влияет на мультилекарственную резистентность клеток опухолевых линий U-251 MG и U-87 MG, принимая участие в формировании фенотипа клеток боковой популяции.

Достоверность результатов и обоснованность выводов

Научные положения, сформулированные автором в диссертации, основаны на изучении достаточного объема материала, постановке необходимых экспериментов, применении современных инструментальных методов анализа и публикации основных положений диссертации. В работе используется многообразие современных методик биохимии и клеточной биологии: молекулярно-биологические методы (выделение

суммарной РНК, синтез кДНК и проведение полимеразной цепной реакции в реальном времени), методы проточной цитофлуориметрии на клеточном сортере Beckman MoFlo XDP и технология измерения электрического импеданса для анализа пролиферации и жизнеспособности клеток на приборе xCELLigence. Результаты характеризуются высокой степенью воспроизводимости, выводы аргументированы, обоснованы и являются следствием результатов выполненных исследований. Работа выполнена на достаточном экспериментальном материале.

Значимость для науки и практики полученных автором результатов

Сигнальный путь Hedgehog влияет на пролиферацию и химиорезистентность клеток низкодифференцированных глиом, таким образом, этот сигнальный путь может рассматриваться в качестве мишени при лечении низкодифференцированных глиом, но только в подгруппе Hedgehog сигналинг-зависимых глиом. Разработанный подход качественной оценки активности сигнального пути является предпосылкой для разработки количественных критериев оценки активности сигнального пути Hedgehog как в стандартных клеточных линиях, так и в первичных культурах опухолевых клеток, полученных после оперативного вмешательства.

Диссертация прошла широкое обсуждение. Материалы диссертации были представлены на IX – X Международных (XVIII – XIX Всероссийских) Пироговских научных медицинских конференциях студентов и молодых ученых (Москва, 2014 – 2015), VIII Московском международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2015), VII Международной научной конференции Science4Health (Москва, 2016), Международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2019). Результаты диссертационной работы были внедрены в научно-исследовательскую деятельность лаборатории нейробиологии ФГБУ «НМИЦПН им. В.П. Сербского» Минздрава России и лаборатории клеточных технологий ФГБУ «ФНКЦ ФМБА России».

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

Результаты данной работы могут быть использованы для оценки активности сигнального пути Hedgehog, оценки влияния других ингибиторов сигнального пути Hedgehog и оценки влияния сигнального пути на чувствительность клеток к различным химиотерапевтическим препаратам. Это будет способствовать подбору комбинаций ингибиторов сигнального пути Hedgehog и наиболее эффективных цитотоксических препаратов, что, в свою очередь, будет способствовать развитию персонализированных подходов в терапии низкодифференцированных глиом.

Личный вклад автора

Черепанов Сергей Александрович принимал непосредственное участие в проведении экспериментов на всех этапах исследования. Автор самостоятельно проанализировал литературу по тематике проблемы, получил, обработал и обобщил полученные данные.

Печатные работы, опубликованные по материалам диссертации

По материалам работы опубликовано 10 печатных работ, в том числе 6 статей в ведущих российских рецензируемых журналах и 4 тезиса докладов.

Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации и автореферата

В диссертационной работе Черепанова Сергея Александровича четко определена цель научного исследования. Поставленные задачи успешно выполнены. Выводы логичны и вытекают из поставленных цели, задач и результатов исследования. Диссертация написана ясным литературным языком с использованием общепринятой терминологии. Оформление диссертации замечаний не вызывает. Автореферат полностью соответствует основному тексту диссертационной работы.

Список сокращений и условных обозначений громоздкий, занимает 6 страниц машинописного текста. Его можно было сократить, объединив вместе интерлейкины (IL-1 β , IL-4, IL-6), кластеры дифференцировки (CD133, CD24), гены кодирующие циклинзависимые киназы (*Cdc2*, *Cdc20*, *Cdc25a*, *Cdc25c*) и т.д. Однако это замечание не носит принципиального характера и не снижает общей высокой оценки работы. В автореферате полностью отражены основные положения диссертации. Принципиальных замечаний к содержанию и оформлению работы нет.

Заключение

Диссертационная работа Черепанова Сергея Александровича на тему «Влияние компонентов сигнального пути HEDGEHOG на пролиферацию и химиорезистентность низкодифференцированных глиом», выполненная под руководством доктора медицинских наук, профессора Чехонина Владимира Павловича, является законченной научно-квалификационной работой, содержащей новое решение актуальной научной задачи по оценке влияния сигнального пути Hedgehog на пролиферацию и химиорезистентность клеток низкодифференцированных глиом, имеющей существенное значение для биохимии. Таким образом, по своей актуальности, научной новизне, теоретической и научно-практической значимости, достоверности полученных результатов и обоснованности выводов диссертационная работа полностью отвечает требованиям на

соискание ученой степени кандидата наук согласно п.9 «Положения о присуждении учёных степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013г. (с изменениями в редакции постановлений Правительства РФ №335 от 21.04.2016 г. и № 748 от 02.08.2016 г.), а сам автор С.А. Черепанов заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – Биохимия.

Отзыв о научно-практической значимости диссертационной работы Черепанова Сергея Александровича на тему «Влияние компонентов сигнального пути HEDGEHOG на пролиферацию и химиорезистентность низкодифференцированных глиом», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – Биохимия, обсужден и утвержден на семинаре лаборатории белков гормональной регуляции (протокол № 8 от 6.05.2019 г.).

Зав. лабораторией, доктор химических наук

Белогуров А.А.

Белогуров Алексей Анатольевич, доктор химических наук, заведующий лабораторией белков гормональной регуляции ФГБУН ИБХ РАН, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая 16/10

Тел. 84957273860

e.mail: alexey.belogurov.jr@gmail.com

Подпись Белогурова А.А. заверяю
Ученый секретарь ФГБУН ИБХ РАН
доктор физико-математических наук,
профессор



Олейников Владимир Александрович

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10, 8(495)335 01 00, office@ibch.ru