

## ОТЗЫВ

официального оппонента Филимоновой Марины Владимировны на диссертационную работу Первушина Николая Викторовича «Механизмы приобретенной устойчивости опухолевых клеток к антагонистам Mcl-1 и MDM2 и способы ее преодоления», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4 - Биохимия.

### Актуальность темы исследования

По данным Всемирной организации здравоохранения, онкологические заболевания занимают второе место среди основных причин смертности в мире и ежегодно уносит жизни миллионов людей. В ходе процесса опухолевого перерождения злокачественные клоны приобретают ряд отличительных черт по сравнению с нормальными клетками. Одной из этих особенностей является устойчивость к различным типам программируемой клеточной гибели, включая апоптоз. Нарушения механизмов запуска апоптотической гибели лежат в основе прогрессии многих типов рака, поэтому ее активация представляет собой перспективную стратегию противоопухолевой терапии. В регуляции апоптоза, которая осуществляется различными генами и их продуктами, важную роль играют члены белкового семейства Bcl-2, которые по функциональным свойствам подразделяются на антиапоптотические (препятствующие гибели) и проапоптотические (способствующие гибели) белки. Повышение уровней белков, препятствующих апоптотической гибели клеток, является частой причиной развития приобретенной устойчивости раковых клеток к запуску апоптоза. К группе антиапоптотических белков, в том числе, относится Mcl-1, антагонисты которого сейчас исследуются в клинических испытаниях.

Транскрипционный фактор p53, поддерживающий стабильность генома, является важнейшим белком-онкосупрессором. Активация p53 за счет блокирования его негативного регулятора MDM2 способствует усилению транскрипции и соответствующему увеличению уровней p53-зависимых проапоптотических белков (Bax, Puma, Noxa), что, в свою очередь, ведет к нейтрализации их антиапоптотических партнеров и запуску апоптоза в опухолевых клетках. В настоящее время ингибиторы MDM2 также активно изучаются на различных этапах клинических исследований.

Серьезной проблемой при использовании любых противоопухолевых препаратов, влияющей на исход лечения, является развитие приобретенной лекарственной устойчивости. Не стали исключением и антагонисты Mcl-1 и MDM2, однако на

сегодняшний день механизмы приобретенной устойчивости к данным препаратам и подходы по ее преодолению остаются малоизученными.

### **Объем и содержание работы**

Диссертация изложена на 170 страницах машинописного текста и включает в себя введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, результаты и их обсуждение, выводы и список литературы, содержащий 270 источников, из которых 266 зарубежных и 4 отечественных. Работа иллюстрирована 46 рисунками и 1 таблицей.

Автореферат полностью соответствует содержанию диссертации.

### **Степень обоснованности и достоверности научных положений и выводов, сформулированных в диссертации**

Основные положения, выносимые на защиту, являются хорошо обоснованными и подкрепляются 8 публикациями диссертанта в международных и отечественных рецензируемых научных изданиях. Кроме этого, обоснованность научных положений и выводов подтверждается качественным анализом 270 литературных источников. Использование современных методов биохимии и молекулярной биологии, получение *in vitro*, *in silico*, *in vivo* и *ex vivo* данных, осуществление экспериментов в нескольких повторах, а также применение методов статистической обработки результатов бесспорно свидетельствуют о высокой степени обоснованности сформулированных диссертантом научных положений и выводов.

### **Новизна научных положений и выводов, сформулированных в диссертации**

Применение антагонистов Mcl-1 и MDM2 является новым направлением в целевой терапии онкологических заболеваний. Исследуемые в работе соединения могут стать основой для разработки новых средств и методов противоопухолевой терапии. Кроме того, в ходе работы получены новые данные, внёсшие вклад в понимание механизмов развития устойчивости опухолевых клеток к действию противоопухолевых агентов, обоснование путей к преодолению такой устойчивости, а также определён ряд потенциальных прогностических маркеров. Так, была обнаружена ключевая роль белка Вак в чувствительности опухолевых клеток к действию ингибиторов Mcl-1; получены ранее неизвестные клеточные модели, обладающие повышенной устойчивостью к действию антагониста Mcl-1 S63845; показано, что одновременное подавление белков Mcl-1 и Bcl-2 или Mcl-1 и Bcl-xL ведёт к преодолению устойчивости раковых клеток к действию антагонистов Mcl-1. Анализ выживаемости пациентов с аденокарциномой

лёгкого, имеющих разные уровни Bcl-xL, Mcl-1 и Bax, выявил, что важное прогностическое значение имеет профиль экспрессии белков семейства Bcl-2. Впервые показан синергический эффект при совместном применении антагонистов Mcl-1 и MDM2 на модели нейробластомы. Кроме того, получена новая клеточная модель нейробластомы, характеризующаяся повышенной устойчивостью к действию антагонистов MDM2, на которой методами *in vitro* и *in silico* определено, что причина резистентности клеток к ингибированию MDM2 заключается в появлении мутаций в структуре p53. В исследованиях *in vitro* и *in vivo* показано, что ни антагонисты Mcl-1, ни ДНК-повреждающие агенты не способны эффективно преодолеть данный тип устойчивости. Также продемонстрировано наличие биологической активности у новых соединений - ингибиторов MDM2, являющихся модификациями препарата Нутлин-3а, обладающих улучшенными физико-химическими свойствами.

Полученные в рецензируемой диссертационной работе результаты позволят внести существенный вклад в усовершенствование современных подходов противоопухолевой терапии, способствовать потенциальному одобрению для клинического применения исследуемых антагонистов Mcl-1 и MDM2 и несомненно обладают научной новизной.

#### **Вопросы и замечания**

Высоко оценивая работу в целом, следует акцентировать внимание на ряде недостатков, требующих доработки и/или исправления:

- раздел «Научная новизна работы» перегружен излишними деталями, что, вероятно, связано со значительным количеством задач исследований. Тем не менее, целесообразно следует провести его редакцию;

- в этом разделе указано: «Исследуемые в рамках данного проекта препараты были разработаны несколько лет назад и сейчас активно исследуются на различных стадиях клинических испытаний». Следует уточнить, как выполненные в рамках диссертационной работы исследования соотносятся с проводимыми клиническими исследованиями?

- глава 2 «Материалы и методы» перечисляет материалы, буферные и рабочие растворы, реактивы и прочее. В этом перечне трудно догадаться, что основной «материал» - исследуемые вещества – спрятан в разделе 2.1.5 «Обработка клеток». Следует это исправить.

- в работе использована база данных пациентов LUAD TCGA. Если она предоставлена в открытом доступе, это следует указать при первом упоминании;

- при анализе выживаемости пациентов с аденокарциномой лёгкого, имеющих разные уровни Bcl-xL, Mcl-1 и Bax (Рис.26) не указано количество пациентов в группах. Кривые Каплана-Мейера демонстрируют, всё же, выживаемость, а не вероятность выживаемости. Следует это исправить;

- разделы 2.2.15 и 3.10 (исследования *in vivo*) изложены не вполне корректно. Не указано, как подсчитывали клеточность опухолевой суспензии, трансплантируемой животным? Всем животным, независимо от веса, вводили равное количество доксорубина? Объём опухоли оценивали лишь в двух изменениях? Вероятно, с этими недочётами связан разброс показателей объёма опухолевого узла. И, несмотря на это, различие в динамике роста опухоли у животных группы SH-SY5Y, получавших доксорубин, представляется значимым, что следует указать (Рис. 42 А);

- в работе приводятся данные о выведенных новых линиях опухолевых клеток и новых синтезированных соединениях - ингибиторах MDM2, обладающих улучшенными физико-химическими свойствами. Вероятно, эти результаты следует защитить авторским правом. Если это было сделано – данные о патентах должны быть представлены в тексте диссертации;

- некоторые технические недочёты снижают качество работы и её восприятие: автор временами путает понятия «доза» и «концентрация»; в ряде рисунков (например, Рис.26, 33 и многие другие) шрифт и изображение уменьшены настолько, что затрудняют их восприятие; список сокращений не включает все использованные сокращения.

Указанные недостатки не носят принципиального характера, не снижают общей положительной оценки работы и могут быть легко устранены при подготовке окончательного варианта диссертации.

### **Заключение**

Таким образом, диссертационная работа Н.В. Первушина «Механизмы приобретенной устойчивости опухолевых клеток к антагонистам Mcl-1 и MDM2 и способы ее преодоления» является законченной научно-квалификационной работой, выполненной под руководством кандидата биологических наук Копеиной Гелины Сергеевны, и содержит новое решение актуальной задачи биохимии по исследованию

причин возникновения резистентности опухолевых клеток к антагонистам Mcl-1 и MDM2. По своей актуальности, научной новизне, теоретической и научно-практической значимости, достоверности полученных результатов и обоснованности выводов диссертационная работа Первушина Николая Викторовича полностью отвечает требованиям на соискание ученой степени кандидата наук согласно п. 9 положения о присуждении ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 г. (с изменениями в редакции постановлений правительства Российской Федерации № 335 от 21.04.2016 г., № 748 от 02.08.2016 г., № 650 от 29.05.2017 г., № 1024 от 28.08.2017 г., № 1168 от 01.10.2018 г., №426 от 20.03.2021 г., № 1539 от 11.09.2021 г., № 1690 от 26.09.2022 г., № 101 от 26.01.2023 г.), а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

Официальный оппонент:

доктор биологических наук

(14.03.06 - Фармакология, клиническая фармакология, 03.01.01 - Радиобиология),

заведующий лабораторией радиационной фармакологии Медицинского радиологического научного центра имени А. Ф. Цыба – филиала Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации (МРНЦ имени А. Ф. Цыба – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России)

 М.В. Филимонова

Подпись Филимоновой М.В. заверяю:

Ученый секретарь МРНЦ им. А.Ф.Цыба – филиала

ФГБУ «НМИЦ радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации,

доктор медицинских наук, профессор



 В.А. Петров

Адрес: 249036, Калужская область, г. Обнинск, ул. Королева, д. 4

Контакты: +7-903-8144013, +7(484)399-71-36

Электронная почта: vladimirovna.fil@gmail.com

« 18 » марта 2024 г.