

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу **Павлюкова Марата Самвеловича** «Роль апоптоза в трансформации опухолей: новые подходы к терапии глиом», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология

Представленная к защите работа Павлюкова М.С. посвящена фундаментальному исследованию роли апоптоза в прогрессии опухолевых заболеваний, а также разработке инновационных подходов к лечению наиболее агрессивного типа рака головного мозга - глиобластоме. Автор провел целый комплекс работ с использованием впечатляющего арсенала новейших методов молекулярной биологии, биохимии и клеточной биологии, направленных, с одной стороны, на исследование внутриклеточных механизмов резистентности опухолей к терапии и, с другой стороны, на определение вклада погибающих клеток в прогрессию и эволюцию злокачественных новообразований. Полученные результаты позволили выявить несколько белков, критически важных для развития глиобластом и создать три новых низкомолекулярных ингибитора данных белков, которые были исследованы как *in vitro* на первичных культурах глиобластомы, полученных от пациентов, так и *in vivo* на моделях человеческих опухолей в иммунодефицитных мышах. Все три соединения показали высокую способность убивать опухолевые клетки в концентрациях на порядки ниже тех, что используются при применении стандартных методов химиотерапии глиобластомы. Другими словами, диссертация Павлюкова М.С. является прекрасным примером работы, выполненной в соответствии с общей концепцией трансляционной медицины: от поиска молекулярных механизмов патологических процессов и определения важнейших мишеней, до создания и тестирования новых веществ, позволяющих замедлить рост раковых клеток *in vivo*.

Основные задачи диссертационной работы Павлюкова М.С. включают в себя изучение молекулярного механизма действия нескольких белков-ингибиторов апоптоза; исследование, сигналов, продуцируемых апоптотическими клетками и их роли в прогрессии опухолей; создание низкомолекулярных соединений, индуцирующих апоптоз в наиболее агрессивных популяциях клеток глиобластомы; и разработка новой методики по определению относительной концентрации низкомолекулярных соединений (в том числе противоопухолевых препаратов) в образцах клеток и тканей глиом.

Работа изложена на 219 страницах и содержит 110 рисунков и 3 таблицы. Она построена по классическому принципу и включает в себя разделы «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы» и «Список литературы». Литературный обзор занимает четверть от объема диссертации и начинается с достаточно подробной и хорошо изложенной информации о механизмах апоптоза и способов его ингибирования. Далее автор логично переходит к описанию новых, полученных в течение последних лет, данных о неожиданной и важной роли апоптоза в межклеточной коммуникации. Обсуждается представление о том, что

апоптотическая гибель клеток может играть ключевую роль в изменчивости опухолей и в их способности развивать резистентность к терапии, однако почти ничего не говорят о молекулярных механизмах сигналинга, индуцируемого апоптотическими клетками, и о том, какова роль этих сигналов в большинстве типов рака. Тем самым обосновывается необходимость дальнейших исследований данного вопроса и подчёркивается научная новизна результатов, полученных в ходе работы, проделанной Павлюковым М.С. Далее подробно описана современная классификация глиом, важнейшие особенности этого типа опухолей, а также основные проблемы, которые ещё предстоит решить для борьбы с данным заболеванием. Наконец, в заключении обзора литературы автором рассмотрены внеклеточные везикулы и их роль в прогрессии рака. В целом обзор литературы включает в себя достаточно полный набор современных работ, значительная часть которых была опубликована за последние 5-10 лет, отлично проиллюстрирован, и позволяет получить хорошее представление о состоянии данной области науки в настоящее время.

Раздел «Материалы и Методы» по объёму составляет около 1/5 диссертации и содержит детальное описание всех методик, использованных автором, в том числе и тех, что были впервые разработаны и опробованы в ходе данного исследования. В соответствии с современными стандартами научных публикаций, раздел украшает подробная и крайне ценная таблица с указаниями на конкретные реактивы, их использованные разведения и коммерческие источники с каталожными номерами.

Раздел «Результаты и обсуждение» составляет основную часть диссертации. Исследования Павлюкова М.С. можно разделить на три направления, которые неразрывно связаны друг с другом:

Первое направление посвящено изучению молекулярных основ апоптоза. В данном разделе автор вначале описывает результаты по исследованию механизмов запрограммированной клеточной гибели. Среди них особый интерес представляет разработка элегантной системы, основанной на безызлучательном переносе энергии (FRET), которая позволила впервые определить конформацию белка Трансглутаминаза 2 в различных компартментах живой клетки и проследить за изменением конформации этого фермента на ранних стадиях апоптоза. Далее следует описание работ по изучению роли апоптоза в коммуникации опухолевых клеток. Именно здесь Павлюковым М.С. были получены наиболее важные, с точки зрения фундаментальной науки, данные. Без преувеличения можно сказать, что автором был впервые продемонстрирован новый механизм межклеточной коммуникации. Так, хорошо известно, что клетки могут передавать сигналы друг другу с помощью лигандов разнообразной природы, взаимодействующих со специфическими белковыми рецепторами, а также благодаря молекулам miRNA, вызывающим деградацию целевых молекул мРНК. В работе Павлюкова М.С. было впервые показано, что в качестве переносчиков сигнала могут выступать белки сплайсосомы, мишенями которых являются молекулы пре-мРНК в реципиентных клетках. Большое количество полученных диссертантом экспериментальных данных позволило проследить последовательность событий, лежащих в основе экспорта сплайсосом из клеток доноров, а также эффекта внеклеточных факторов

сплайсинга на клетки реципиенты. Важно отметить, что автором был не только продемонстрирован новый механизм межклеточной коммуникации, но и подробно изучена роль этого процесса в развитии опухолей головного мозга. Павлюкову М.С. удалось показать, что внеклеточные сплайсосомные белки появляются после терапии, а также при достижении опухолью достаточно больших размеров и способствуют мезенхимальной трансформации клеток глиобластомы, которая лежит в основе возникновения резистентности. Важно отметить, что сам феномен мезенхимальной трансформации был многократно описан в клинических и молекулярно-биологических исследованиях глиобластом, однако причина такого процесса оставалась загадкой. Таким образом, автор, с одной стороны, продемонстрировал новый фундаментальный механизм межклеточной коммуникации, а, с другой стороны, показал его клиническую значимость.

Исследования диссертанта в рамках второго направления были посвящены разработке инновационных подходов к лечению глиобластомы. На основе результатов первого этапа работ автором были выбраны три наиболее перспективные мишени для терапии глиобластом. Далее, используя методы компьютерного моделирования, скрининга библиотек низкомолекулярных соединений и химического синтеза, Павлюковым М.С. были получены новые низкомолекулярные ингибиторы для выбранных белков. Эффективность этих соединений была подтверждена при анализе ферментативной активности рекомбинантных белков, а также на первичных культурах клеток глиобластомы *in vitro* и на мышинных моделях человеческой глиобластомы *in vivo*. Благодаря аккуратным и всесторонним исследованиям диссертанта был достигнут самый важный прикладной результат данной работы – создано соединение СМР3а. Этот низкомолекулярный ингибитор продемонстрировал способность убивать клетки глиобластомы в наномолярных концентрациях, а также позволил на порядок увеличивать их чувствительность к радиотерапии. Важно отметить, что данное соединение показало свою эффективность не только на культурах клеток, полученных от более чем 10 различных пациентов, но и продемонстрировало хорошие результаты в доклинических испытаниях на животных.

Наконец, третье направление исследований диссертанта в большей мере имеет методическую ориентацию и посвящено разработке нового способа детекции распределения противоопухолевых препаратов и других низкомолекулярных соединений в клетках и срезах глиобластомы. Павлюкову М.С. удалось достигнуть впечатляющего пространственного разрешения при детекции исследуемых молекул (400x400x10 нм), хотя достоверность идентификации этих соединений, а также чувствительность метода в целом и вызывают пока много вопросов.

Из вышеизложенного следует, что в диссертационной работе Павлюкова М.С. получены новые фундаментальные знания о роли апоптоза в прогрессии опухолей, на основе которых были предложены инновационные подходы к лечению глиобластомы – одной из самых смертоносных и социально значимых опухолей человека. В отношении данной работы может быть высказан ряд критических замечаний, которые не умаляют достоинства работы в целом, но могут быть полезны при ее дальнейшем развитии.

I. Комментарии к Обзору литературы:

- 1.1. По поводу термина «компенсаторная пролиферация» есть мнение, что его следует употреблять в более узком смысле, когда речь идет о регенерации здоровой ткани, и отличать от пролиферативных сигналов, индуцированных апоптозом (Mollereau et al, Cell Death and Differentiation, 2013, 20: 181).
- 1.2. Рисунок 31 имеет недостаточно высокое разрешение, в результате не все обсуждаемые в тексте наблюдения можно рассмотреть.
- 1.3. Имеются недочеты в согласовании слов и пунктуации (они встречаются и в остальных частях текста).

II. Комментарии к разделу Материалы и Методы:

- 2.1. Список ключевых материалов приведен на английском языке, в то время как в тексте некоторые из использованных реагентов называются по-русски
- 2.2. Не приведены последовательности синтетических олигонуклеотидов ("праймеров")

III. Комментарии и вопросы к разделу Результаты и обсуждение:

- 3.1. В главе 4.1.2 не удалось обнаружить информации о том, какая линия клеток использовалась. Если эта линия была единственная, возникает вопрос о том, насколько эти результаты можно обобщать.
- 3.2. Что можно сказать о посттрансляционных модификациях мутантных вариантов сурвивина? Могли ли мутации повлиять на эффективность ацетилирования, вызвав таким образом непрямой эффект?
- 3.3. Недостаток информации о том, какие клетки использовались, имеется и далее по тексту. Так, на рис. 48 показаны результаты по локализации PON2 в нескольких клеточных линиях, а на рис. 49 - в какой-то одной, но не сказано, в какой. Лучше всего было бы указывать используемую клеточную линию в подписи к каждому из релевантных рисунков.
- 3.4. На ряде рисунков авторе не уделено достаточного внимания деталям (можно предположить, что это связано с впечатляющим объемом экспериментальных данных). В качестве примеров можно привести рисунок 43, где на панели А аннотация не позволяет понять, какая из полос является специфической, а на панели Б легенда обозначает лишь 3 кривые из 5. Другой пример - рисунок 59, где на панели А резко выделяется "Взаимодействие организмов" - единственная категория белков, которыми обогащены контрольные везикулы (в отличие от везикул, выделяемых апоптотическими клетками глиобластомы). Это бросающееся в глаза наблюдение не только нигде не обсуждается, но и обозначено с опечаткой.
- 3.5. В списке ключевых материалов приведены две линии иммунодефицитных мышей, мыши с тяжелым комбинированным иммунодефицитом NOD scid и "голые" бестимусные мыши NU/J, однако о том, каких мышей использовали в каждом конкретном эксперименте, информации нет: в разделе "Материалы и Методы"

сказано лишь, что использовали либо тех, либо других. Однако две эти линии мышей фенотипически вовсе не идентичны, хотя и похожи. Как и в случае с культурам клеток, эту информацию следовало включить в подписи под рисунками.

3.6. Ингибиторы сурвивина, киназы NEK2 и альдегид дегидрогеназы ALDH1A3, полученные в ходе работы, преждевременно называть противоопухолевыми препаратами, пока это в лучшем случае базовые соединения. Можно также отметить, что вывод 7, посвященный этим веществам, перегружен цифрами, в результате чего резко отличается от остальных, похвально лаконичных.

В заключении отзыва следует отметить, что приведенные комментарии ни в коей мере не умаляют достоинств диссертации и ее автора. Автореферат соответствует содержанию диссертации, а сама диссертация полностью отражена в научных статьях, опубликованных автором в ведущих российских и зарубежных журналах, результаты работы доложены на отечественных и международных конференциях.

Таким образом, диссертация Павлюкова М.С. «Роль апоптоза в трансформации опухолей: новые подходы к терапии глиом» полностью отвечает требованиям "Положения о присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; от 29.05.2017 г. № 650), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а её автор Павлюков Марат Самвелович заслуживает присуждения искомой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

Официальный оппонент:

член-корр. РАН, профессор РАН, д.б.н.

Главный научный сотрудник

лаборатории передачи внутриклеточных

сигналов в норме и патологии ФГБУН

Института молекулярной биологии им.

В.А. Энгельгардта Российской академии наук

Купраш Дмитрий Владимирович

Россия, 119991, г. Москва, ул. Вавилова, д. 32.

Тел: +7 916-655-00-98, e-mail: kuprash@gmail.com

Подпись Купраша Дмитрия Владимировича заверяю

Учёный секретарь ФГБУН Институт молекулярной биологии

им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук



к.в.н. Бочаров А.А