

## **ОТЗЫВ**

**официального оппонента доктора биологических наук**

**Прасолова Владимира Сергеевича**

на диссертационную работу **Кондратьевой Лии Германовны** «Роль регуляторных мастер генов в развитии рака поджелудочной железы», представленную на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология

### **Актуальность темы диссертационной работы**

Смертность от злокачественных заболеваний занимает второе место после сердечно-сосудистых заболеваний, причем в последние годы отмечается рост числа заболевших. Разработка эффективных методов борьбы с раковыми заболеваниями невозможна без глубокого понимания клеточных и молекулярных процессов, лежащих в основе их возникновения и прогрессии. Очевидно, что решение этой проблемы является одним из серьезных вызовов фундаментальной биологии и современной биомедицине.

Многочисленные исследования молекулярных детерминант злокачественных клеток и разных стадий опухолевой прогрессии и выявили множество белковых факторов, по-видимому, вовлеченных в процесс канцерогенеза, однако до сих пор много вопросов остается без ответа. Для того, чтобы пролить свет на остающиеся неясными вопросы, необходимы детальные молекулярно-генетические данные по биологическим особенностям разных видов опухолей и их метастазов. Исследование генетических регуляторных процессов канцерогенеза, в частности, метастазирования, и поиск потенциальных генов для воздействия на опухоль является высоко значимой научной проблемой, решение которой может принципиально изменить направление современной онкологии и медицины.



Диссертационная работа Кондратьевой Л.Г. посвящена исследованию рака поджелудочной железы и некоторых регуляторных мастер генов (РМГ), ответственных за координацию эмбрионального развития поджелудочной железы человека. Рак поджелудочной железы – злокачественное новообразование, возникающее из эпителия железистой ткани или протоков поджелудочной железы. Заболеваемость раком поджелудочной железы ежегодно увеличивается. Эта болезнь занимает шестое место по распространённости в мире среди онкологических заболеваний у взрослого населения. Поражает преимущественно людей пожилого возраста, одинаково часто мужчин и женщин.

В работе проведен анализ уровня экспрессии РМГ в норме и в процессе канцерогенеза, обсуждается возможность использования этих РМГ в качестве мишеней для диагностики и терапии рака поджелудочной железы, изучено поведение этих генов во время ключевого для запуска метастазирования процесса эпителиально-мезенхимального перехода и исследовано влияние одного из выбранных мастер генов, PDX1, на особенности пролиферации и подвижность клеток рака поджелудочной железы.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация написана по традиционному плану на 111 страницах, содержит 24 рисунка, 6 таблиц и 194 ссылки на литературные источники. Диссертация построена по классическому плану и включает следующие разделы: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и их обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Список сокращений», «Список литературы».

Обзор литературы состоит из нескольких разделов, в первом из которых автор приводит актуальную информацию о современных проблемах онкологических заболеваний и о статистических данных по заболеваемости и



смертности от злокачественных заболеваний в России и мире. Второй раздел посвящен общим закономерностям процессов эмбриогенеза и канцерогенеза, в частности, эпителиально-мезенхимальному переходу, стволовым клеткам, а также выдвигается концепция ключевой роли мастер генов эмбриогенеза в опухолевой прогрессии. Дальнейшая часть обзора литературы посвящена анализу мастер генов развития поджелудочной железы и их взаимодействиям во время эмбриогенеза поджелудочной железы. Особое внимание автора сфокусировано на нескольких наиболее важных транскрипционных регуляторах, которым и посвящено исследование. Обзор литературы достаточно содержателен и дает развернутое представление о современном состоянии проблемы.

Раздел «Материалы и методы» свидетельствует о высоком современном методическом уровне проведенных экспериментов, обеспечившим получение достоверных результатов. Для решения поставленных задач автором применен широкий арсенал современных молекулярно-биологических методов и методов клеточной биологии. Для проведенных анализов были использованы препараты, полученные из клинического материала, клеточные модели рака поджелудочной железы и, сконструированная совместно с сотрудниками Института молекулярной генетики РАН, модель миграции (подвижности) злокачественных клеток.

### **Научная новизна исследования, полученных результатов и выводов, сформулированных в диссертации**

Основные результаты работы можно разделить на три части. Во-первых, исследованы уровни экспрессии генов *PDX1*, *PTF1a*, *SOX9*, *GATA4*, *HNF1b* в образцах опухолей поджелудочной железы, образцах нормальной зрелой поджелудочной железы и поджелудочной железы эмбрионов. Почти для всех исследованных генов, за исключением *HNF1b*, показан высокий уровень экспрессии в образцах поджелудочной железы эмбрионов относительно уровня экспрессии этих генов в нормальной поджелудочной железе. В



опухолевых образцах обнаружен сниженный по сравнению с нормальной тканью уровень экспрессии гена *PTF1a*, для генов *SOX9* и *PDX1* такая закономерность оказалась справедливой только для части образцов. Оценивая уровень экспрессии гена *PDX1*, автор выделяет две группы образцов рака поджелудочной железы: с низким уровнем экспрессии и с примерно равным уровнем экспрессии *PDX1* в нормальной поджелудочной железе. Сравнение уровня экспрессии гена *SOX9* в опухолевых образцах приводит к разделению образцов уже на три группы: с высоким, равным норме и сниженным уровнем экспрессии гена *SOX9*. При этом автор указывает на корреляцию между значениями экспрессии *SOX9* и *PDX1*. Изменений в экспрессии генов *GATA4* и *HNF1b* в образцах рака поджелудочной железы по сравнению с экспрессией в нормальных тканях поджелудочной железы найдено не было. Данная часть исследования была посвящена проверке гипотезы о рекапитуляции генов эмбриональных регуляторов в опухолях, и на основании проведенного исследования автор делает вывод о том, что для данных РМГ эмбрионального развития для данного типа опухоли такое правило не соблюдается. Примеры реактивирующихся при канцерогенезе эмбриональных генов приведены автором в обзоре литературы.

Вторая часть работы посвящена выбору клеточной модели для исследования выбранных генов в процессе метастазирования. В клетках пяти линий рака поджелудочной железы были оценены уровни экспрессии генов маркеров эпителиального и мезенхимального состояния клеток и генов эмбриональных транскрипционных регуляторов развития поджелудочной железы. Выбрана чувствительная к фактору *TGFb1* и индукции эпителиально-мезенхимального перехода линия клеток *PANC1*. Моделирование процесса эпителиально-мезенхимального перехода и оценка изменений экспрессии генов эмбриональных транскрипционных регуляторов является важной частью диссертационной работы. Автором было отмечено



негативное влияние программы эпителиально-мезенхимального перехода, индуцированного TGFb1, на экспрессию генов регуляторов развития поджелудочной железы *SOX9*, *GATA4*, *FOXA2*.

В третьей части исследования особое внимание диссертант уделяет гену *PDX1* и исследует эффект его экспрессии на перевиваемые клетки рака поджелудочной железы двух линий, отличающихся по эпителиально-мезенхимальным характеристикам. Автор указывает, что при экспрессии в них гена *PDX1* происходят изменения экспрессии генов маркеров эпителиально-мезенхимального перехода и эмбриональных транскрипционных факторов. Отличающиеся ответы клеток разных линий на экспрессию *PDX1* автор объясняет различным эпигенетическим состоянием регуляторных областей генома. Такой вывод основан на биоинформатическом анализе существующих данных иммунопреципитации хроматина этих клеточных линий. Выявлено влияние экспрессии гена *PDX1* на пролиферацию клеток. Главным значительным результатом работы является обнаружение подавления способности клеток рака поджелудочной железы к миграции. Эти данные получены в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

### **Теоретическая и практическая значимость**

Итогом исследования стало расширение фундаментальных знаний о механизмах развития и злокачественной трансформации поджелудочной железы. Для фундаментальной науки существенный интерес представляет наблюдение о том, что в отличие от некоторых видов рака, при злокачественном перерождении поджелудочной железы не происходит возрастания уровней экспрессии мастер генов *PDX1*, *PTF1a*, *SOX9*, *GATA4*, *HNF1b* до уровня экспрессии этих генов в клетках поджелудочной железы эмбрионов.

Практическая значимость работы заключается в выявлении высокой гетерогенности экспрессии мастер генов *PDX1*, *PTF1a*, *SOX9*, *GATA4*, *HNF1b*



в образцах тканей аденокарциномы поджелудочной железы, на основании которой автор заключает, что экспрессия этих генов не может быть использована в дальнейшем в качестве диагностических маркеров. Кроме того, в исследовании был продемонстрирован антиметастатический потенциал гена *PDX1*. Дальнейшие исследования генетических факторов, влияющих на миграционные свойства клеток рака поджелудочной железы, помогут использовать выявленные свойства гена *PDX1* для разработок новых подходов к борьбе с метастазированием.

### **Замечания к диссертации**

К сожалению, в тексте диссертации и автореферата встречаются опечатки, стилистические и грамматические ошибки.

В тексте диссертации встречаются некорректные выражения, такие как «эпителиальные/мезенхимальные гены» или «высокая/низкая стадия развития опухоли». Ясно, что автор имел в виду «генов эпителиальных/мезенхимальных маркеров или характеристик» и «высокая/низкая степень злокачественности» однако сформулировал не совсем корректно.

В разделе «Заключение» диссертации приводится фраза следующего содержания: «В ходе исследования экспрессии мастер генов развития поджелудочной железы в опухолевых образцах нами было сделано наблюдение, что в более чем половине исследованных образцов рака ПЖ, наблюдается пониженное содержание ключевого мастер регулятора развития ПЖ – *PDX1*». В диссертационной работе проводилось исследование только экспрессии гена *PDX1* в опухолевых образцах, содержание белкового продукта гена *PDX1* не было оценено, поэтому использовать такую формулировку ошибочно.

Не вполне ясна логика расположения образцов на Рис. 8А: на графиках с индивидуальной экспрессией исследованных мастер генов опухолевые



образцы расположены по возрастанию уровня экспрессии гена SOX9, но в части рисунка Б порядок образцов соответствует увеличению экспрессии гена PDX1. Не вполне ясно изменение приведенного на Рис. 8А порядка образцов. Данный момент требует разъяснений.

В разделе с результатами моделирования процесса эпителиально-мезенхимального перехода и исследования поведения выбранных мастер-генов во время этого процесса, при переходе к мезенхимальному фенотипу показано снижение экспрессии генов *SOX9*, *GATA4*, *FOXA2*. Не связано ли это с тем, что данные гены характерны именно для эпителиальных, а не мезенхимальных клеток, и эти изменения не являются следствием эпителиально-мезенхимального перехода?

Сделанные замечания не снижают ценности проделанной работы и несут рекомендательный характер. Они не подвергают сомнению адекватность использованных методов и достоверность полученных результатов. Выводы логично вытекают из результатов. Диссертационная работа является новым, интересным исследованием, проведенным и на высоком теоретическом и практическом уровне и опирается на хорошую методическую базу.

### **Общее впечатление о диссертационной работе**

Работа Кондратьевой Л.Г. представляет собой многостороннее исследование, в котором использованы самые современные методы.

### **Автореферат**

Автореферат полностью соответствует содержанию диссертации, результаты которой отражены в 10 статьях в научных рецензируемых журналах, входящих в перечень изданий, рекомендованных Минобрнауки РФ для опубликования результатов диссертации, а также в тезисах докладов и материалах 11 российских и международных конференций.



## Заключение

По актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости диссертационная работа Кондратьевой Лии Германовны «Роль регуляторных мастер генов в развитии рака поджелудочной железы» полностью соответствует требованиям «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. №842 (с изменениями в редакции постановлений Правительства Российской Федерации №335 от 21.04.2016 г., №748 от 02.08.2016 г., №1024 от 28.08.2017 г. и №1-168 от 01.10.2018 г.), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор Кондратьева Лия Германовна заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальности «03.01.03 – Молекулярная биология».

Официальный оппонент

**Прасолов Владимир Сергеевич,**

доктор биологических наук, профессор,  
главный научный сотрудник лаборатории

клеточных основ развития злокачественных заболеваний

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта  
Российской академии наук (ИМБ РАН)

Контактные данные:

Телефон: 8(499)135-23-11

E-mail: [prassolov45@mail.ru](mailto:prassolov45@mail.ru)

Почтовый адрес: 119991, Москва, улица Вавилова, дом 32

Подпись д.б.н. Прасолова В.С. заверяю:

Ученый секретарь ИМБ РАН

Кандидат ветеринарных наук



3.06.2020

Бочаров Александр Анатольевич