

## **Отзыв**

официального оппонента на диссертацию

**Чепановой Арины Александровны**

«Разработка ингибиторов тирозил-ДНК-фосфодиэстеразы 1 в качестве сенсibilизаторов действия ингибитора топоизомеразы 1», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. – молекулярная биология

### **Актуальность темы исследования**

Онкологические заболевания стоят на втором месте по смертности после сердечно – сосудистых заболеваний как в России, так и во всем мире. Заболеваемость от злокачественных новообразований неуклонно растет, тем самым представляя угрозу для общественного здравоохранения. Таким образом, разработка новых таргетных препаратов является актуальным направлением современной медицинской химии, молекулярной биологии, биохимии и медицины. Перспективным рассматривается поиск ингибиторов ферментов системы репарации ДНК, в связи с тем, что именно эта система восстанавливает повреждения ДНК после алкилирующего действия имеющихся на рынке противоопухолевых препаратов или ионизирующего излучения, используемого в радиотерапии опухолей. Одной из мишеней для разработки таргетных препаратов является фермент Tdp1, препятствующий накоплению ковалентных аддуктов топоизомеразы 1 с ДНК за счет гидролиза 3' фосфотирозильной связи. Известно, что стабилизирующие промежуточный ковалентный комплекс Top1–ДНК ингибиторы Top1 применяются в клинической практике для лечения ряда онкологических заболеваний (например, камптотецин (СРТ)). Tdp1 удаляет тройной комплекс Top1–ДНК–СРТ, и таким образом Tdp1 противостоит ингибиторам Top1, являясь возможной причиной лекарственной устойчивости некоторых видов рака. Применение ингибиторов Tdp1 будет способствовать преодолению лекарственной устойчивости, наблюдаемой при использовании производных камптотецина, ингибирующих комплекс Top1. Целью данной работы являлся поиск ингибиторов Tdp1 среди производных природных биологически активных веществ и изучение их способности сенсibilизировать опухоли к действию ингибитора Top1 топотекана – противоопухолевого препарата, используемого в клинике.

### **Научная новизна, теоретическая и практическая значимость исследования**

Автором диссертации впервые были изучены производные хромена, адамантана, а также цианопроизводные усниновой кислоты (УК), фураноновые производные УК и гидразонотиазольные производные УК с различными заместителями в качестве ингибиторов Tdp1. Определены перспективные соединения - эффективными сенсibilизаторами оказались гидразонотиазольные производные УК. Впервые показано, что при использовании топотекана и гидразонотиазольных производных УК (9e или



20d): (1) накапливается количество повреждений ДНК в клетках; (2) популяция опухолевых клеток (аденокарциномы протоков молочной железы человека MCF7) в состоянии позднего апоптоза увеличивается; (3) противоопухолевый и антиметастатический эффект топотекана усиливается.

Несомненно, работа имеет как теоретическую, так и практическую значимость – *in silico* и *in vitro* исследован огромный пул соединений, эффективных ингибиторов Tdp1 на основе природных биологически активных соединений в отношении перевиваемых линий опухолевых клеток. В процессе работы автор определил соединение – кандидат, усиливающий действие уже имеющегося на рынке противоопухолевого препарата (Топотекан), и требуются дальнейшие доклинические испытания, по результатам которых можно уже с большей уверенностью говорить о перспективности использования соединения в дальнейшем.

### Структура и объем диссертации

Диссертационная работа Чепановой А.А. соответствует требованиям к оформлению кандидатской диссертации и содержит все необходимые разделы: оглавление, список сокращений, введение, литературный обзор, материалы и методы, результаты и обсуждения, заключение, выводы, список литературы, приложение. Работа (без приложения) изложена на 154 страницах, включает 53 рисунка и 9 таблиц. Список литературы включает 244 источника. Приложение на 32 страницах включает 9 таблиц.

В разделе «Введение» автор кратко формулирует актуальность, цель и задачи проводимого исследования, а также его научную новизну и практическую значимость.

В обзоре литературы автор описывает фермент тирозил-ДНК-фосфодиэстеразу 1, обозначает роль этого фермента в репарации ДНК, приводит описание известных ингибиторов Tdp1. Автор подробно излагает состояние научной проблемы, дает заключение в конце данной главы, предлагая пути решения. В частности, дальнейший поиск ингибиторов, определение их собственной цитотоксичности и сенсibiliзирующего эффекта по отношению к топотекану, оценка ДНК-повреждающего и апоптотического действий, а также экспериментальное доказательство возможности применения в качестве противоопухолевого и антиметастатического препарата *in vivo*.

Глава «Материалы и Методы» содержит описание современных молекулярно-биологических и биохимических методов, использованных в работе, а именно, флуоресцентный метод определения ингибирующих концентрации, оценка цитотоксичности соединений, молекулярное моделирование, метод щелочного электрофореза одной клетки, метод двойного окрашивания клеток Annexin V-FITC/PI, оценка продолжительности жизни модельных животных, противоопухолевого и анти-метастатического действий, при введении наиболее эффективного препарата. Данная глава написана достаточно подробно, чтобы можно было воспроизвести поставленные эксперименты.



В главе «Результаты и обсуждение» Чепановой А.А. проанализирована ингибирующая активность соединений на основе усниновой кислоты (УК) в отношении рекомбинантного фермента репарации ДНК Tdp1. Наиболее эффективными сенсibilизаторами оказались гидразонотиазольные производные усниновой кислоты, ингибирующие Tdp1 в наномолярном диапазоне концентраций. При совместном использовании топотекана и гидразонотиазольных производных УК 9e или 20d происходит накопление повреждений ДНК, вызванных топотеканом. Исследование про-апоптотического эффекта 20d показало, что его использование в комбинации с топотеканом приводит к увеличению популяции поздних апоптотических клеток. Показано, что производные УК 20d обладают способностью усиливать противоопухолевый и антиметастатический эффект топотекана на мышинной модели карциномы легкого Льюиса.

Заключение в полной мере отражает суть работы, содержит обсуждение полученных результатов исследования. Анализ основных положений диссертационного исследования позволяет сделать вывод, что диссертация является законченным научно-исследовательским трудом, выполненным на высоком научном уровне. Основные положения диссертационной работы опубликованы в журналах из перечня ВАК (8 статей), а также неоднократно докладывались на российских и международных конференциях (всего 6).

Выводы, сделанные в работе, полностью отражают полученные результаты.

#### **Общая характеристика работы**

В целом диссертация Чепановой А.А. оценивается положительно, однако имеются следующие замечания:

1. Список сокращений содержит повторы аббревиатур.
2. Во Введении имеется тафтология некоторых слов, орфографические ошибки, неудачные связки текста. Подраздел введения «Научная новизна полученных результатов» должен содержать только информацию о том, что сделано впервые диссертантом, а не описание проведенных работ.
3. Глава «Литературный обзор» написан очень подробно и хорошо, однако присутствуют редакторские правки. В конце обзора при описании соединений, изученных автором, хочется большего обоснования, почему они не вошли в результаты диссертации, хотя автор и говорит о перспективности их изучения в плане увеличения сенсibilизирующего эффекта к топотекану.
4. В главе «Материалы и Методы», имеющееся название пункта 2.2.2. лучше изменить на оценку ингибирования Tdp1 соединениями на основе УК, например. В пунктах 2.2.1, 2.2.5, 2.2.6 не полно описаны методики, например, не понятно на какой клеточной линии выполнен метод «ДНК- комет». Также в п. 2.2.7. необходимо предоставить ссылку на первоисточник о методике подсчета метастазов поверхностным методом.
5. В главе «Результаты и Обсуждение» также присутствуют недочеты:
  - 5.1. Неудачная подпись к рисунку 3.1., лучше было бы подписать «Оценка ингибирующей способности исследуемых соединений по отношению к Tdp1»,

например. Разрешение рисунка очень низкое, не видно какая кривая соответствует каком ингибитору, легенда отсутствует.

5.2. На рисунке 3.5. Б. изображены графики только для соединения 46а, хотя в ходе работы были выделены несколько перспективных соединений производных адамантана (рис. 3.5.А, и см. стр. 85). Аналогичное замечание к рисункам 3.13, 3.14.

5.3. Автор почему-то не оперирует в тексте индексом селективности, хотя в таблицах и приводит.

5.4. На стр. 91 отсутствует график показывающий оценку синергизма соединения OL7-43 с топотеканом, хотя он не цитотоксичен и  $IC_{50}$  равен 2,86 мкМ, что сопоставимо с выбранными соединениями – кандидатами.

5.5. На стр. 103 - 104 отсутствует график – «Влияние производного УК на выживаемость клеток MCF7 и на цитотоксический эффект топотекана», хотя автор и приводит в Табл. 3.3. значения  $CC_{50}$ , ведь в дальнейшем исследуется проапоптотическое действие на этой клеточной линии.

5.6. Не понятно, при исследовании повреждающего действия топотекана совместно с 20d все образцы содержали ДМСО в концентрации 1%? Или это неудачное описание методики и представление рисунков 3.24, 3.25, из которых не понятно, что с чем сравнивали.

5.7. В пункте 3.3. нет обоснования, почему не проведены исследования проапоптотического действия ингибитора TdpI - 9e, хотя он тоже является соединением – кандидатом. Аналогичное замечание к пункту 3.4.

5.8. На стр.127 при описании группы 2 не совсем понятен выбор разовой дозы - 1,5мг/кг веса, при этом есть сноска, что «выбранная доза топотекана неэффективна против первичной опухоли при четырехкратном введении» - это ваша гипотеза, это результат предварительной работы или в процессе данного исследования вы это выяснили?

5.9. Противоопухолевый эффект обычно оценивают по торможению роста опухоли (ТРО), по кривым Каплана – Майера, к сожалению, они не представлены в диссертационной работе.

5.10. Также в п.3.4.1. отсутствует описание подсчета метастазов и ссылки на первоисточники, описывающее релевантность подсчета поверхностным методом.

6. Выводы №5 и №6 следовало бы написать более подробно, написать на какой клеточной модели или на сколько усиливает противоопухолевой и антиметастатический эффект, например, не хватает конкретики.

7. В целом, работа недостаточно обсуждена с точки зрения сравнения полученных результатов с аналогичными, полученными в других лабораториях.

### Заключение

Диссертация Чепановой А.А. является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение задачи - поиск ингибиторов Tdp1 среди производных природных биологически активных веществ и изучение их способности сенсibilизировать опухоли к действию



топотекана – противоопухолевого препарата, используемого в клинике. Таким образом, работа Чепановой Арины Александровны соответствует требованиям, установленным пп. 2.1–2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, предъявляемым к кандидатским диссертациям. Автор диссертации Чепанова Арина Александровна заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. – молекулярная биология.

Дымова Майя Александровна,  
кандидат биологических наук,  
старший научный сотрудник  
лаборатории биотехнологии  
Института химической биологии  
и фундаментальной медицины  
Сибирского отделения Российской  
академии наук (ИХБФМ СО РАН)  
Почтовый адрес: 630090, г. Новосибирск,  
просп. акад. Лаврентьева, д 8  
Телефон: +7 (383) 363-51-50  
Электронная почта: dymova@niboch.nsc.ru

Дата « 17 » июля 2017 г.



Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт химической биологии и фундаментальной медицины  
Сибирского отделения Российской академии наук  
Подпись М. А. Дымова  
Зав. канцелярией Дымова