

ОТЗЫВ

официального оппонента члена-корреспондента РАН, доктора медицинских наук, профессор Н.Л. Шимановского на диссертацию Дерябиной Ольги Николаевны «Пути преодоления химиорезистентности тройного негативного рака молочной железы в коренной популяции жителей республики Мордовия (экспериментально-морфологическое и молекулярно-генетическое исследование)» на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальностям 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология, 3.3.2. Патологическая анатомия

Актуальность темы диссертации

Рак молочной железы (РМЖ) находится на втором месте в структуре онкологической заболеваемости и поражает четверть женщин со злокачественными новообразованиями. Показатель заболеваемости РМЖ в женской популяции в мире колеблется между 27 на 100 тыс. женщин в Центральной Африке и Восточной Азии до 92 на 100 тыс. женщин в Северной Америке. В то же время смертность от заболевания существенно ниже в развитых странах, где наблюдается высокая выживаемость пациенток. Наиболее неблагоприятной формой РМЖ является тройная негативная (ТН) форма опухоли, которая характеризуется гетерогенным ответом на стандартную химиотерапию, почти 50% впервые диагностированных неоплазий имеют неполный ответ на неоадьювантную химиотерапию.

Несмотря на значительные достижения в области противоопухолевой фармакологии, химиотерапия, включающая различные комбинации лекарственных средств, повреждающих ДНК опухолевых клеток (антрациклиновые антибиотики, препараты платины, алклилирующие средства) и ингибиторы митоза (таксаны), остается средством стандартной терапии при первичном ТН РМЖ.

Описанные обстоятельства диктуют необходимость разработки персонализированной стратегии в отношении каждого случая ТН РМЖ с учетом молекулярно-генетических факторов первичной и приобретенной химиорезистентности. В этой связи считаю, что Дерябина Ольга Николаевна

поставила перед собой амбициозную, актуальную и своевременную задачу по определению основных путей развития и преодоления резистентности ТН РМЖ.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Обоснованность научных положений и выводов, сформулированных в диссертации О.Н. Дерябиной, несомненна и подтверждается целым рядом обстоятельств: 1) привлечением исчерпывающих данных об особенностях фармакоэкономики и фармакоэпидемиологии ТН РМЖ в популяции жительниц национального субъекта Российской Федерации с компактным проживанием финно-угорских этносов; 2) применением современных технологий внеэкспериментального количественного анализа структура – активность, а также методов молекулярного докинга потенциальных противоопухолевых структур с активными центрами идентифицированных онкогенных драйверов, имеющих значение в формировании резистентности ТН РМЖ; 3) использованием современных, валидированных и международно-признанных моделей болезни – органоидной трехмерной клеточной опухолевой культуры, ксенографтной модели человеческой опухоли с использованием гуманизированных животных в качестве носителя для изучения фармакологического действия соединений; 4) получением научных доказательств на основе патоморфологических и иммуногистохимических, молекулярно-биологических, генетических, иммуноферментных методов количественного определения биологических маркеров в образцах опухоли; 5) использованием линейных и нокаутных лабораторных животных и клеточных культур из банка опухолевых штаммов; 6) использованием современного лабораторного оборудования; 7) использованием адекватных решаемым задачам методов вариационной статистики с применением параметрических и непараметрических критериев, методов прогнозирования, сравнения и оценки продолжительности жизни животных, а также лицензионного программного обеспечения.

Оценка достоверности и новизны диссертационного исследования

Впервые проведено комплексное молекулярно-фармакологическое и патоморфологическое обоснование пути преодоления химиорезистентности тройного негативного рака молочной железы в популяции коренного этноса Республики Мордовия на основе разработки и изучения кандидата в новое противоопухолевое лекарственное средство молекулярно-направленного действия, оригинального отечественного соединения – производного пиридинкарбоновой кислоты.

Впервые установлено, что опухолевые клетки представительниц коренного этноса региона экспрессируют ген *EGFR* с большей частотой мутаций в указанном гене, чем в популяции жителей Мордовии других национальных групп.

При проведении культурального и молекулярно-генетического исследования показано значение основных внутриклеточных механизмов – активации обратного транспорта молекул лекарственного вещества, экспрессии и мутаций гена *BRCAl*, экспрессии микроРНК-218 и микроРНК *Let-7* – в формировании первичной резистентности клеток тройного негативного рака молочной железы к средствам стандартной противоопухолевой терапии заболевания – доксорубину, цисплатину, паклитакселу и эрлотинибу.

При проведении количественного математического анализа «структура – активность» в ряду производных пиридинкарбоновых кислот показан высокий потенциал ряда молекул в качестве перспективных кандидатов для поиска противоопухолевой активности. При сравнительном токсикологическом исследовании впервые показано, что при внутрижелудочном и парентеральных (внутривенном и внутривенном) путях введения показатели ЛД₅₀ и ЛД₁₀₀ для восьми новых отечественных соединений – производных пиридинкарбоновых кислот – колеблются в диапазоне от 150 до 900 мг/кг, что в целом позволяет отнести серию соединений к умеренно токсичным или нетоксичным веществам.

В культурах клеток рака молочной железы, колоректального рака и рака мочевого пузыря человека впервые изучен спектр противоопухолевой активности в ряду производных пиридинкарбоновых кислот с оптимальными токсикологическими характеристиками. Установлены оптимальные подавляющие концентрации, составившие в культуре эстроген-зависимого РМЖ MCF-7 для соединения ЛХТ-13-19 – $3,8 \times 10^{-5}$ М и для соединения ЛХТ-17-19 – $1,6 \times 10^{-5}$ М. На модели сингенного лейкоза у мышей впервые установлены эффективные терапевтические дозы наиболее активных молекул: для соединения ЛХТ-13-19 – 18,9 мг/кг и для соединения ЛХТ-17-19 – 8,8 мг/кг при внутрибрюшинном введении.

Впервые доказано, что соединение N-(5-метилпиридин-2-ил)-3-пиридинкарбоксамид (ЛХТ-13-19) неэффективно в отношении культуры ТН РМЖ, экспрессирующей белок VSCR, следовательно, вещество подвергается первичному обратному транспорту из клеток опухоли. С применением аналитической методики определения концентрации производного 4Н-хромена – N-ацетиламиноэтаноата 2-Аминия-7-(диэтиламино)-4-(4-метоксибензо[d][1,3]диоксол-5-ил)-4Н-хромен-3-карбонитрила (соединение ЛХТ-16-19 или альтернативный шифр – АХ-554) было установлено, что после трех раундов культивации органоидной культуры ТН РМЖ с соединением активируется механизм вторичной резистентности, связанный с эффлюксом молекулы из клетки. Доказано, что клетки ТН РМЖ первично высокочувствительны к соединению ЛХТ-17-19, вторичная резистентность формируется слабо, и она не связана с обратным транспортом молекулы и гиперэкспрессией мутантного гена *BRCA1*.

При проведении экспериментов по молекулярному докингу 9-амино-3,3-диметил-3,4-дигидроакридин-1(2H)-она 2-гидроксипутандиоата (соединение ЛХТ-17-19) с использованием кристаллографических структур потенциальных мишеней – макромолекул, участвующих в канцерогенезе – впервые установлено, что наиболее выраженный аффинитет молекулы вещества наблюдается относительно киназы C-abl, рецептора CSF1 и

киназного центра EGFR.

Впервые разработана воспроизводимая платформа ксенографтного трижды негативного рака молочной железы представительницы коренной нации Республики Мордовия, пригодная для персонализированной трансляционной медицины и фундаментальных патоморфологических и фармакологических исследований. С использованием платформы у гуманизированных мышей BALB/c *nu/nu* установлено противоопухолевое и антиметастатическое действие ЛХТ-17-19 как кандидата в антибластомное лекарственное средство. Впервые показана взаимосвязь между развитием противоопухолевого эффекта и подавлением экспрессии маркера канцерогенеза – гена *EGFR*, а также экспрессии некоторых микроРНК для соединения ЛХТ-17-19 на ксенографтной модели ТН РМЖ.

Значимость для науки и практики полученных автором результатов

Результаты исследования позволяют расширить современные представления о популяционных, патоморфологических и фармако-эпидемиологических особенностях тройного негативного рака молочной железы в Российской Федерации.

Полученные экспериментальные результаты, раскрывающие важнейшие механизмы формирования первичной и вторичной фармакорезистентности опухолевых клеток ТН РМЖ к средствам стандартной терапии, после соответствующей клинической валидации могут транслироваться в практику.

Разработанная и валидированная биологическая платформа ксенографтного тройного негативного рака молочной железы, экспрессирующего EGFR, может быть широко применена как *in vivo* патоморфологический эквивалент канцерогенеза для изучения биологии опухолевого роста и прогрессии, а также в качестве модели при проведении трансляционных исследований в онкофармакологии.

Соответствие диссертации паспортам научной специальности

Диссертационное исследование соответствует п. 1 «Поиск новых

биологически активных фармакологических веществ среди природных и впервые синтезированных соединений, продуктов биотехнологии, геной инженерии и других современных технологий на экспериментальных моделях патологических состояний» и п. 3 «Исследование механизмов действия фармакологических веществ в экспериментах на животных, на изолированных органах и тканях, а также на культурах клеток» паспорта научной специальности 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология и п. 1 «Распознавание и характеристика определяющих возникновение и развитие конкретных заболеваний (нозологических форм), на основании прижизненных и постмортальных патологоанатомических исследований клеток, тканей, органов и организма при использовании современных методических и технологических возможностей морфологии в сочетании с молекулярной биологией, молекулярной генетикой и эпигенетикой», п. 3 «Исследование структурных, молекулярно-клеточных и молекулярно-генетических механизмов развития заболеваний в целом и отдельных их проявлений (симптомы, синдромы), создание основ персонализированной патогенетической терапии и профилактики» научной специальности 3.3.2. Патологическая анатомия.

Оценка структуры и содержания диссертации

Диссертационное исследование имеет традиционную структуру, состоит из введения, главы 1 (литературного обзора), главы 2 с описанием материалов и методов исследования, шести глав с изложением полученных результатов, заключения, выводов и практических рекомендаций.

Работа изложена на 284 страницах компьютерного текста, иллюстрирована 77 рисунками, 12 таблицами. Библиографический список состоит из 341 литературных источников, из которых 225 – иностранных.

Во введении О.Н. Дерябина формулирует актуальность, новизну и практическую значимость работы, цель и задачи исследования, ключевые положения, выносимые на защиту. Глава 1 посвящена изложению современных взглядов о молекулярных основах формирования, прогрессии и

прогнозирования рака молочной железы. Обзор изложен хорошим литературным языком, читается легко, интересно.

Во второй главе автор детально описывает дизайн исследования, дает характеристику исследуемым в работе группам лекарственных веществ, представляет подробную характеристику объектам исследования – ксенографтной опухолевой ткани, двухмерным и трехмерным клеточным культурам, животным – носителям ксенографтных опухолей и животным, участвующим в проведении фармакодинамического фрагмента работы. Обращает особое внимание подробная проработка диссертантом вопросов внеэкспериментального прогнозирования фармакологического соединений, а также методологических аспектов постановки экспериментов *in vivo* и *in vitro*.

В главах 3-7 автор приводит основные результаты, полученные в ходе выполнения работы. В 3-ей главе автором подробно изучена фармако- и патозэпидемиология рака молочной железы в Республике Мордовия в сравнении с Российской Федерацией. В 4-й главе показана роль эффлюкса молекул, мутации гена *BRCA1*, вовлеченности некоторых микроРНК в формировании противоопухолевой химиорезистентности тройного негативного рака молочной железы с противоопухолевыми препаратами, применяемыми для лечения данной патологии. В 5-й и 6-й главах представлены результаты по изучению токсикологического профиля и противоопухолевой активности новых перспективных молекул производных пиридикарбоновых кислот. Седьмая глава посвящена докинговым исследованиям соединения ЛХТ-17-19, согласно которой молекула ЛХТ-17-19 обладает выраженным аффинитетом к киназе C-abl, рецептору CSF, рецептору EGFRK. Восьмая глава содержит результаты разработки ксенографтной модели рецидивного тройного негативного рака молочной железы с последующим изучением ЛХТ-17-19 при курсовом внутрибрюшинном введении, которое продемонстрировало противоопухолевую активность: подавляло рост опухолевого узла при

сравнении как с контролем, так и с таргетным препаратом эрлотинибом, повышало выживаемость животных и ограничивало метастатический процесс.

В заключении Ольга Николаевна Дерябина обобщает и систематизирует полученные результаты в сравнительном аспекте с привлечением литературного материала

По теме диссертационного исследования опубликовано 23 научные работы, из них 7 статей – в журналах, входящих в перечень ВАК при Минобрнауки России, 8 статей – в журналах, индексируемых международными системами цитирования Scopus и Web of Science.

Замечания и вопросы: имеющиеся в диссертационном исследовании некоторые технические недочеты и погрешности не снижают общего положительного впечатления о работе. Однако в ходе ознакомления с диссертацией у меня возникли следующие вопросы:

1. Желательно пояснить, почему при проведении докинга взаимодействия синтезированных соединений с рецепторными структурами и другими молекулами-мишенями с PDB файлов ID: 6NPE, 5MQT, 4R7I, 1M17, 4KN2, 6KN4 были удалены молекулы воды, ионы и лиганды, а также уточнить, имеется ли корреляция между результатами докинга и экспериментальными данными?

2. Выявлено ли изменение фармакологической активности синтезированных соединений и изучаемых лекарственных средств и способности клеток к обратному транспорту в процессе культивирования клеточных линий?

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационное исследование Дерябиной Ольги Николаевны «Пути преодоления химиорезистентности тройного негативного рака молочной железы в коренной популяции жителей республики Мордовия (экспериментально-морфологическое и молекулярно-генетическое исследование)» на соискание ученой степени доктора медицинских наук по

специальностям 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология, 3.3.2. Патологическая анатомия, представляет собой самостоятельно выполненную завершенную научно-квалификационную работу, содержащую решение актуальной проблемы по разработке эффективного пути преодоления химиорезистентности тройного негативного рака молочной железы. Считаю, что, по актуальности, объему выполненных исследований, новизне полученных данных и их научно-практической ценности, диссертация О.Н. Дерябиной соответствует требованиям п. 15 Положения о присуждении ученых степеней в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), утвержденного приказом ректора от 06.06.2022 г. № 0692/Р, предъявляемым к докторским диссертациям, а ее автор Дерябина Ольга Николаевна заслуживает присуждения искомой ученой степени по специальностям 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология, 3.3.2. Патологическая анатомия.

Официальный оппонент

Заведующий кафедрой молекулярной фармакологии и радиобиологии имени академика П.В. Сергеева Медико-биологического факультета Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор

Николай Львович Шимановский

Подпись чл.-корр. РАН проф. Н.Л. Шимановского заверяю:

31.03.2023г.

Ученый секретарь ФГАОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова»

Минздрава России, к.м.н, доцент

О.М. Демина

Адрес: 117997, г. Москва, ул. Островитянова, дом 1; телефон: +7 (495) 434-03-29; e-mail: rsmu@rsmu.ru

