

## ОТЗЫВ

официального оппонента, PhD, доктора биологических наук, профессора кафедры общей и биоорганической химии, ведущего научного сотрудника лаборатории биомедицинского материаловедения научно-образовательного института биомедицины ФГБОУ ВО «ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова» МЗ РФ Шаройко Владимира Владимировича на диссертационную работу Кучура Олега Александровича «Механизмы усиления гибели p53-положительных опухолевых клеток при комбинировании ионизирующего излучения и ингибиторов CDK8/19-зависимого перепрограммирования транскрипции», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия

**Актуальность работы.** Смена фаз клеточного цикла, репарация генетических повреждений, гибель или жизнеспособность клеток регулируются множеством разнообразных механизмов, среди которых одним из наиболее изученных является p53-зависимый механизм. Белки семейства p53 представляют собой транскрипционные факторы и необходимы для остановки репликации ДНК и запуска программ репарации; при этом в случае сильного стрессового сигнала и значительных клеточных повреждений запускается гибель клеток. При этом до сих пор остаётся актуальным вопрос о роли семейства p53 в реакциях клеток на ионизирующее излучение; более того, имеются противоречивые данные о значении p53 как молекулярной мишени и прогностического маркера в лучевой терапии. Ситуация осложняется вариабельностью p53-зависимых ответов при облучении разных опухолей, даже в линиях клеток одной тканевой принадлежности. Изучение механизмов направленной супрессии или активации p53-зависимых механизмов при минимизации негативных эффектов, не связанных с ответами на повреждение, является актуальной медико-биологической задачей. Стратегия повышения чувствительности опухолевых клеток к ионизирующему излучению при модуляции p53 и запуске p53-ассоциированного апоптоза через CDK8/19-зависимое перепрограммирование транскрипции может быть новым подходом в лечении онкологических заболеваний. В связи с этим актуальность данной диссертационной работы не вызывает сомнений.

В рецензируемом исследовании О.А. Кучуром было проведено изучение роли CDK8/19 в регуляции выживаемости/гибели опухолевых клеток человека в зависимости от

статуса p53 при сочетанном действии ионизирующего излучения и ингибиторов циклин-зависимых киназ. Выбранное направление исследований относится к современным проблемам биохимии, поскольку затрагивает проблему биохимических и молекулярно-клеточных механизмов p53-зависимой и независимой регуляции жизнеспособности опухолевых клеток. По сути, работа представляет собой фундаментальный труд, направленный на решение практических медицинских задач. Работа была выполнена в ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский Национальный исследовательский университет ИТМО», научной базе, в последнее время уделяющей большое внимание решению теоретических и прикладных биомедицинских проблем, что также подтверждает значимость проведенной работы.

**Научная новизна.** В проведенном О.А. Кучуром исследовании получены новые знания о молекулярных механизмах повышения гибели облученных клеток с интактным p53 при ингибировании CDK8/19: предотвращение индукции гена TP53. Показано, что ингибирование CDK8/19 в облученных клетках с интактным p53 функционально сходно с нокаутом гена TP53.

Впервые выявлены механизмы регуляции p53-зависимых процессов с участием ядерного фактора NFκB при ингибировании CDK8/19 и определены белки-партнеры p53, чувствительные и нечувствительные к ингибиторам CDK8/19. В работе выявлен феномен регуляции выживания опухолевых клеток человека, подвергнутых воздействию терапевтических доз ионизирующего излучения, в зависимости от статуса p53 и активности CDK8/19. С использованием клеточной модели показана возможность повышения эффективности лучевого воздействия при его комбинировании с нетоксичными ингибиторами CDK8/19.

**Теоретическая и практическая значимость результатов исследования.** Диссертационная работа О.А. Кучура имеет большое научно-теоретическое значение, поскольку является фундаментальной по направленности и нацеленной на решение конкретных практических фармакологических и медицинских задач. Полученные результаты позволяют расширить наши знания о биохимических и молекулярно-биологических механизмах регуляции экспрессии генов эукариот в ответ на внешние воздействия. Установленная взаимосвязь транскрипционного фактора p53 и циклин-зависимых протеинкиназ 8/19 – модуляторов перепрограммирования транскрипции – имеет общебиологическое значение. Полученные в рамках диссертационного исследования материалы имеют большой потенциал использования в медицине, а именно: для

оптимизации консервативной терапии опухолей с использованием нетоксичных селективных ингибиторов перепрограммирования транскрипции.

**Степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов, результатов и практических рекомендаций, сформулированных в диссертации.** Диссертация О.А. Кучура написана на актуальную тему, хорошим научным языком. Методическую и экспериментальную часть дополняет обзор литературы, в котором подробно изложено современное состояние проблемы, что позволило автору четко сформулировать цель и задачи исследования. Для выполнения работы использовался широкий арсенал современных методов исследования (проточная цитометрия, обратная транскрипция и количественная ПЦР в режиме реального времени, ПААГ-ДСН электрофорез белков, иммуноблоттинг, клоногенный и цитохимический анализ). Для обработки результатов были использованы современные методы статистического анализа. В целом, рассматриваемая диссертация является завершенным исследованием, которое отличается новизной, имеет научную и практическую значимость. Поставленную цель в диссертационной работе следует считать достигнутой благодаря корректной методической основе, полученные результаты, обладающие научной новизной – убедительными, сформулированные по результатам исследования выводы – аргументированными.

**Структура и оформление работы.** Работа изложена на 133 страницах, содержит 1 таблицу и 49 рисунков. Построение диссертации традиционное и соответствует ГОСТу РФ. Диссертация включает введение, обзор литературы, главу материалы и методы исследования, главу собственных результатов, главу обсуждения результатов, заключение с выводами и списка цитированной литературы. Список литературы включает 243 источников. Автореферат диссертации полностью передаёт её содержание.

**Полнота изложения результатов диссертации в опубликованных работах.** Результаты диссертационного исследования изложены в 3 научных публикациях в журналах из перечня, рекомендованного ВАК РФ и индексируемых в базах Scopus и Web of Science, зарегистрирован один патент №2777869, а также представлено 7 работ в материалах Российских и международных конференций. Данная работа проводилась при финансовой поддержке мегагранта Минобрнауки Российской Федерации № 14.W03.31.0020 (руководитель Ронинсон И.Б.) и РФФИ «Аспиранты» № 20-34- 90046 (руководитель Штиль А.А.).

**Замечания и вопросы по диссертационной работе.**

В целом диссертация производит исключительно положительное впечатление. В процессе защиты хотелось бы услышать ответы на следующие вопросы.

1. Как автор представляет роль внутриклеточных окислительно-восстановительных процессов в исследуемых механизмах? Ионизирующее излучение вызывает массивный окислительный стресс, а p53 известен как один из сенсоров гиперактивации окислительных процессов. Кроме p53, на окисление отвечает и NFκB – кофактор CDK8/19. Можно ли связать указанные процессы и механизмы в единую схему?

2. Известно, что белки семейства p53 – p63 и p73 – активируются в ответ на генотоксический стресс (включая ионизирующее излучение), запуская апоптоз либо арест клеточного цикла, тем самым выполняя сходные с p53 функции. Могут ли эти белки таким же образом отвечать на ингибирование киназ CDK8/19 и играть существенную роль в выживании p53-положительных и p53-нокаутных клеток?

3. В диссертационном исследовании установлены механизмы усиления гибели p53-положительных опухолевых клеток при действии ионизирующего излучения и ингибиторов перепрограммирования транскрипции на экспериментальных клеточных моделях *in vitro*. Какие, по Вашему мнению, могут возникнуть проблемы при транслировании выявленных механизмов и наблюдаемых эффектов на целостный организм.

В диссертации выявлены мелкие опечатки и стилистические неточности, также в списке цитированной литературы отсутствует цитирование отечественных литературных источников. Перечисленные выше вопросы и замечания не влияют на основные выводы и защищаемые положения диссертации О.А. Кучура.

**Заключение.** На основании вышеизложенного, считаю, что диссертационная работа Кучура Олега Александровича на тему «Механизмы усиления гибели p53-положительных опухолевых клеток при комбинировании ионизирующего излучения и ингибиторов CDK8/19-зависимого перепрограммирования транскрипции» представленная к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия, выполненная под руководством доктора медицинских наук Штиля Александра Альбертовича является законченной научно-квалификационной работой. Рецензируемое научное исследование Кучура Олега Александровича по актуальности, высокому методическому уровню, научной и практической значимости соответствует п. 9 Положения ВАК Министерства образования РФ, утвержденного постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 (редакция от 21.04.10.2016 г. № 335) о порядке присуждения ученых степеней на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор, Кучур Олег

