

УТВЕРЖДАЮ

Директор

Федерального государственного
бюджетного научного учреждения

«Томский национальный

исследовательский медицинский центр

Российской академии наук»

член-корр РАН, д-р биол. наук,

профессор



В.А. Степанов

2020 г.

Отзыв

ведущей организации Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», о научно-практической значимости диссертационной работы Губаревой Екатерины Александровны на тему «Влияние постоянного освещения и введения мелатонина на канцерогенез и экспрессию часовых генов в опухолях у мышей», представленной к защите в диссертационный совет Д 208.052.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 14.01.12 – онкология.

Актуальность темы диссертационного исследования

Циркадианные, или суточные, ритмы играют важную роль в регуляции поведенческих и физиологических функций в организме млекопитающих. На клеточном уровне суточные ритмы поддерживаются благодаря работе системы часовых генов и белков, включающей гены семейства *Bmal*, *Clock*, *Per*, *Cry*. Белки, кодируемые часовыми генами, образуют несколько транскрипционно-трансляционных контуров обратной связи, которые обеспечивают ритмическую экспрессию определенной доли транскрипта.

Доказательства того, что канцерогенез и нарушение суточных ритмов взаимосвязаны, получены в эпидемиологических исследованиях, экспериментах с животными, при исследовании опухолевого материала человека и животных, в опытах на клеточных культурах. В частности,

доказано, что сменная работа, приводящая к нарушению циркадианных ритмов, увеличивает риск развития рака некоторых локализаций. Данные экспериментов, в которых изучалось влияние нарушения суточных ритмов (нестандартный режим освещения или выключение часовых генов в организме) на развитие опухолей, несколько противоречивы. Тем не менее в большинстве таких работ обнаружено, что нарушение суточных ритмов способствует опухолевому росту. Кроме того, известно, что подавление или индукция экспрессии часовых генов, а также применение антагонистов часовых белков влияет на способность к пролиферации, миграции и инвазии злокачественных клеток, что свидетельствует о вовлечении механизмов регуляции суточных ритмов в опухолевую прогрессию.

За несколько десятилетий исследований установлено, что в опухолях человека различных локализаций экспрессия большинства часовых генов изменяется по сравнению с соответствующей нормальной тканью. Ранее гены семейства *Period* даже рассматривали как антионкогены, но к настоящему моменту с помощью биоинформатических методов показано, что в опухолях нарушается именно согласованная во времени экспрессия часовых и многих других генов. В качестве аналогии такому рассогласованию транскрипции генов приводят оркестр без дирижера. Несмотря на огромное количество данных, накопленных по данному вопросу, остается неясным, на каком этапе канцерогенеза «ломаются» клеточные «часы» и есть ли возможности повлиять на них.

Вместе с этим, описаны нарушения некоторых ритмических показателей в организме при развитии опухолей. В частности, у онкологических больных нарушаются циклы сна-бодрствования, ритм секреции некоторых гормонов. В исследованиях последних лет продемонстрированы изменения ритма экспрессии часовых генов в тканях и органах, непосредственно не затронутых опухолевым процессом, а также суточные изменения транскриптома и метаболома здоровых тканей при развитии опухолей. Данный вопрос нуждается в дальнейшем изучении,

поскольку принципы хронохимиотерапии основываются на том, что в здоровых тканях ритмы пролиферации и метаболизма не совпадают с ритмами опухоли. Все это делает актуальным проведение исследований по изучению факторов регуляции суточных ритмов в аспекте формирования опухолей и их влияния на экспрессию часовых генов при опухолевом росте.

Диссертационное исследование Е.А. Губаревой направлено на решение этой задачи и может прояснить механизмы изучаемых процессов не только теоретически, но и с точки зрения перспектив практического применения, в частности хронохимиотерапии.

Научная новизна исследования и ценность полученных результатов

В рассматриваемой диссертационной работе впервые проведен анализ экспрессии часовых генов и содержания часовых белков в химически индуцированных опухолях легкого и кожи и в опухолях молочной железы у мышей, трансгенных по HER2/neu. Показано, что в опухолях легкого и молочной железы по сравнению с нормальной тканью повышается содержание часовых белков-активаторов транскрипции BMAL1 и CLOCK.

При этом выявлено, что в спонтанных опухолях молочной железы отсутствуют суточные колебания экспрессии часовых генов. Установлен важный факт, что развитие опухолей влияет на суточные изменения экспрессии часовых генов в тканях, не затронутых непосредственно опухолевым процессом – печени и центральном осцилляторе организма – супрахиазматическом ядре, а также на суточные изменения пролиферативной активности кишечного эпителия. В эксперименте подтверждено, что нарушение светового режима способствует развитию злокачественного процесса, а мелатонин его ингибирует, причем только в условиях постоянного освещения.

Полученные автором результаты указывают на фундаментальный характер работы, однако представленные данные имеют и прикладное

значение. Установленный диссертантом факт угнетения канцерогенеза при введении мелатонина открывает возможности регуляции с использованием препаратов хронобиотиков. Применение хронобиотиков в лечении онкологических пациентов потенциально может не только повысить эффективность лечения, но и улучшить качество жизни за счет стабилизации суточных ритмов. Из результатов работы следует, что при проведении терапии у онкологических пациентов или при исследованиях по оценке эффективности химиотерапии в эксперименте, необходимо учитывать влияние опухоли на суточные ритмы организма в целом.

Обоснованность и достоверность полученных результатов и сформулированных выводов

Цель диссертационного исследования, задачи, выводы и положения, выносимые на защиту, сформулированы автором корректно и последовательно в соответствии с методологией работы. Исследование проведено на достаточно большом экспериментальном материале с использованием трех классических моделей опухолевого роста, что обусловило получение достоверных данных. Использованные методы адекватны для решения задач, сформулированных в работе, статистический анализ данных проведен с применением адекватных методов. Сформулированные положения и выводы аргументированы и логически вытекают из анализа результатов выполненного исследования.

Автореферат и опубликованные работы отражают основные положения и выводы диссертации. Результаты диссертационного исследования опубликованы в 15 печатных работах, включая 4 статьи в журналах, рецензируемых ВАК Министерства образования и науки Российской Федерации, и 1 главу в зарубежном издании.

Выводы соответствуют поставленным в работе задачам, полностью обоснованы и отражают полученные результаты.

Оценка содержания работы

Диссертация написана на 163 страницах машинописного текста по традиционному плану, состоит из введения, обзора литературы, главы описания материалов и методов, главы результатов собственных исследований, обсуждения результатов, заключения, выводов и списка литературы. В работе процитировано 273 источника, из них 261 на иностранных языках. Работа хорошо иллюстрирована 15 таблицами и 41 рисунком.

Во введении автором обоснованы актуальность исследования, научная новизна, научно-практическая значимость. Сформулированы цель и задачи работы, описаны методология и методы исследования, личный вклад автора. Приводятся положения, выносимые на защиту, обосновано соответствие диссертации паспорту научной специальности.

В главе «Обзор литературы» дается подробное описание циркадианных ритмов и часовых генов у млекопитающих и механизмов их регуляции. Далее описана взаимосвязь между часовыми генами и ключевыми характеристиками злокачественного процесса, приводятся данные об изменении экспрессии часовых генов в опухолях. В разделе «Нарушение циркадианных ритмов как канцерогенный фактор» систематизированы сведения о влиянии нарушения режима освещения и/или выключения часовых генов на развитие опухолей. Обзор литературы завершается разделом, посвященным антиканцерогенным свойствам мелатонина. Данная глава диссертации написана понятным языком и дает исчерпывающее представление о проблемах, которым посвящена работа.

В главе «Материалы и методы» автор приводит характеристики используемых препаратов, экспериментальных животных, дизайн экспериментальных исследований, лабораторные методы, принципы и использованные методы статистической обработки результатов.

В третьей главе представлены и подробно проанализированы результаты выполненных экспериментов. В первом эксперименте проводилась оценка влияния постоянного освещения и введения мелатонина на канцерогенез легкого у мышей. Было показано, что противоопухолевое действие мелатонина проявляется только у животных, подвергнутых постоянному освещению. В ткани легкого и в опухолях оценивались экспрессия часовых генов и содержание часовых белков. В опухолях легкого по сравнению с нормальной тканью выявлено повышение содержания белков-активаторов транскрипции BMAL1 и CLOCK, тогда как повышения экспрессии генов, кодирующих эти белки, не обнаружено. Во втором опыте оценивали влияние постоянного освещения и введения мелатонина на канцерогенез кожи у мышей. Как и в первом опыте, было выявлено противоопухолевое действие мелатонина при постоянном освещении. В коже и папилломах кожи была проведена оценка содержания часовых белков, в результате чего выявлены разнонаправленные изменения содержания BMAL1, CRY и CLOCK в опухолях. Третий опыт, проведенный на мышках с аденокарциномами молочной железы линии FVB, трансгенных по HER2/neu, посвящен исследованию суточных колебаний экспрессии часовых генов и белков и пролиферации кишечного эпителия. В нем автором не было выявлено ритмичности экспрессии исследуемых генов и белков в опухолях. При этом обнаружено, что развитие опухолей молочной железы влечет за собой нарушение суточных колебаний экспрессии часовых генов и пролиферации эпителия тощей кишки. Кроме того, в опухолях молочной железы наблюдалось, как и в опухолях легкого, повышение содержания белков BMAL1 и CLOCK по сравнению с нормальной тканью.

В главе «Обсуждение результатов собственных исследований» автор проводит сопоставление собственных результатов с данными мировой литературы и приводит аргументы, поясняющие полученные результаты. Вызывает вопрос диссонанс между генной и белковой экспрессией часовых

белков, которому трудно найти объяснение. По-видимому, стоит в дальнейшем уделить этому внимание.

Таким образом, поставленная цель диссертационного исследования и задачи полностью решены. На основе полученных результатов автором сформулированы шесть выводов, все они научно обоснованы и следуют из полученных результатов. Автореферат и научные публикации достаточно полно отражают содержание диссертационной работы, замечаний по автореферату нет. Диссертация написана хорошим литературным языком, хорошо иллюстрирована. Принципиальных замечаний нет.

Вопрос:


Как Вы можете объяснить теоретически диссонанс между генной и белковой экспрессией часовых белков в опухолях?

Заключение

Диссертация Губаревой Екатерины Александровны «Влияние постоянного освещения и введения мелатонина на канцерогенез и экспрессию часовых генов в опухолях у мышей», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, является самостоятельной законченной квалификационной работой. В исследовании представлена совокупность новых данных о роли суточных ритмов и их экзогенных и эндогенных регуляторов в канцерогенезе, экспрессии часовых генов в опухолях, как основа для решения задачи коррекции суточных ритмов при опухолевом процессе. По научному уровню, актуальности и новизне, теоретической и практической значимости диссертационная работа полностью соответствует требованиям пункта 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. №842 (с изменениями от 01.10.2018 г. №1168), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор, Губарева Екатерина Александровна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.01.12 – онкология.

Диссертационная работа рассмотрена и отзыв одобрен на заседании межлабораторного семинара НИИ онкологии Томского НИМЦ 07 февраля 2020 года (протокол №89 от 07 февраля 2020 года).

Заведующий лабораторией
молекулярной онкологии и иммунологии
Научно-исследовательского института
онкологии Федерального государственного
бюджетного учреждения «Томский национальный
исследовательский медицинский центр
Российской академии наук»,
доктор биологических наук, профессор,
член-корреспондент РАН

 Чердынцева Н.В.

Адрес: 634009, Россия, г. Томск, пер Кооперативный 5
Тел.: 8(3822)51-10-39, e-mail: nvch@tnimc.ru


Подпись Н.В. Чердынцевой удостоверяю:

Ученый секретарь Томского НИМЦ

К.б.н.

Дата 07 02 2020





Хитринская И.Ю.