

О Т З Ы В

официального оппонента на диссертационную работу

Ажибека Дулата Мейирбековича

«ИНГИБИРОВАНИЕ ТЕЛОМЕРАЗЫ ЧЕЛОВЕКА»,

представленной на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – биорганическая химия.

Диссертационная работа Д.М.Ажибека посвящена поиску новых ингибиторов теломеразы, фермента, играющего ключевую роль в процессах пролиферации клеток. Значимость изучения этого фермента определяется тем, что его активация происходит в подавляющем большинстве опухолей человека. Теломераза является уникальным белок-нуклеиновым комплексом, специфически активируемым в опухолях без видимой специфичности. Это свойство теломеразы, как специфического маркера опухолевых клеток, позволяло предполагать, что поиск ингибиторов теломеразы позволит получить некую субстанцию, контролирующую рост многих опухолей. Увы, и, к сожалению, несмотря на многочисленные попытки получения таких ингибиторов, практически известен лишь один, который проходит в настоящее время III фазу клинических испытаний.

Именно поэтому поиск ингибиторов теломеразы несомненно представляется актуальным и практически значимым для клинической практики.

Поиск ингибиторов теломеразной активности имеет серьезные сложности в силу гетерогенности систем, где может тестироваться сама активность. Это возможность а) ингибирования ферментативной реакции при постановке реакции *in vitro*, в) ингибирования теломеразной активности при тестировании на линии опухолевых клеток, т.е. *in vitro*, и наконец, с) тестирование на подавление роста опухолей на экспериментальных животных и только после прохождения всех этих этапов

тестирование в процессе клинических испытаний.

В рецензируемой диссертации была поставлена задача создания потенциальных ингибиторов теломеразы в системах *in vitro* и *in vivo*.

Автор четко формулирует цели и задачи исследования, методические подходы к решению этих задач, аргументирует все положения продуманными экспериментами и логическими выводами.

Сама диссертация построена по традиционному типу и состоит из следующих разделов: введения, обзора литературы, результатов и обсуждения, материалов и методов, выводов, списка литературы и приложения. Несмотря на сложные вопросы работа изложена всего на 142 страницах, проиллюстрирована 40 рисунками (!) и 9 таблицами.

В литературном обзоре рассмотрены пути возможного воздействия на теломеразу на различных этапах биогенеза и работы теломеразы. Другой раздел посвящен природе тех соединений, которые могут быть потенциальными ингибиторами теломеразы. Таким образом, литературный обзор является продуманным подходом для понимания экспериментальной части работы.

Переходя к анализу экспериментальной части работы следует прежде всего отметить логику построения работы. Именно поэтому, на первом этапе были отработаны методы детекции теломеразной активности. За основу был использован так называемый TRAP-aasay (telomerase repeat amplification protocol). Но, для поиска новых ингибиторов теломеразы этот метод имеет определенные ограничения. В связи с этим автору предстояло разработать количественную оценку этого метода, исключить возможную деградацию веществ в клеточном экстракте и ингибирование ПЦР исследуемыми веществами. Это было сделано за счет снижения концентрации “продукта удлинения теломеразной реакции” до концентрации ниже порога ингибирования ПЦР, но достаточное для амплификации количества матрицы. Естественно, это повлекло за собой необходимость повышения содержания теломеразы в экстракте. Была разработана новая система повышения

экспрессии теломеразы в клетках и для этого использовалось введение соответствующей генно-инженерной конструкции в определенный тип клеток, содержащий ориджин репликации “раннего” гена EBNA-1 вируса Эпштейна-Барр. Таким образом, была получена адекватная система тестирования теломеразной активности для последующего тестирования в ней ингибирующих олигонуклеотидов. Эта система позволяла измерять ингибирование теломеразы веществами, влияющими на ПЦР и стабилизирующими G-квадруплексы. В результате скрининга низкомолекулярных соединений этим методом ингибирующим свойствами обладали производные антра[2,3-b]тиофен-5,10-диона, 2-алкилтио-5-арилметилден-4Н-имидазолин-4он и его медь содержащий комплексы.

Вторая часть работы посвящена разработке новых подходов к ингибированию теломеразы и состоит из двух частей – дизайн химерных бифункциональных олигонуклеотидов и ингибирование теломеразы химерными олигонуклеотидами *in vitro*.

Автором предложен оригинальный подход к ингибированию теломеразы, основанный на использовании олигонуклеотидов, препятствующих сборке активного комплекса. Идея работы состояла в том, чтобы ограничить сближение двух доменов в составе РНК TR, которое необходимо для функциональной активности теломеразы. Для этого был предложен химерный олигонуклеотид, связанный нуклеотидным линкером. В соавторстве с Т.С.Зацепиным было синтезировано несколько таких соединений, которые затем исследовались в системах *in vivo* и *in vitro*. Всего было протестировано более 20 олигонуклеотидов. В процессе выполнения этой работы были решены многие непростые методические вопросы, которые были сформулированы самим автором и даны четкие ответы на каждый из них. К числу таких вопросов относится выбор олигонуклеотидных последовательностей, входящих в химеры и выбор длины линкера.

Очевидно, что в процессе работы возникали множество различных эффектов, особенно при тестировании системы *in vivo*, и автор находит

объяснение этим явлениям и затем экспериментально подтверждает свою точку зрения. Результаты этой части работы позволяют утверждать, что предложенная идея ингибирования теломеразы на уровне ее сборки имеет право на существование и это принципиально новый вклад в понимание возможных механизмов ингибирования теломеразы. Кроме того, полученная информация подтверждает данные о том, что функциональная активность теломеразы проявляется при ее существовании в форме димера и это также получено с использованием химерных олигонуклеотидов, ингибирующих активность теломеразы.

На мой взгляд, это очень хорошая диссертация, поскольку в ней с одной стороны, решен вопрос о принципиально новом подходе к ингибированию теломеразы на уровне ее сборки, а с другой - разработан и практически использован широкий спектр методов для доказательства правильности этой идеи и раздел «Приложение» яркое тому подтверждение.

У меня есть лишь одно замечание – мне представляется, что тестирование ингибиторов только на одной клеточной линии недостаточно для окончательных выводов, желательно использовать несколько и различного происхождения.

Результаты отражены в 4 статьях в международных журналах и еще в 2 международных журналах, по-видимому, в виде тезисов на международных конференциях.

В целом можно сказать, что работа посвящена очень сложной и интересной проблеме и выполнена на очень высоком уровне. Получены новые данные, которые вносят вклад в понимание механизмов функционирования теломераз, являющихся основными регуляторами пролиферации клеток. Выводы работы соответствуют результатам, автореферат и публикации отражают основное содержание диссертации. Диссертационная работа Ажибека Д.М. полностью соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям и изложенным в пунктах 9-14 Постановления Правительства РФ «О порядке присуждения

ученых степеней» (№842 от 24 сентября 2014 г.), а её автор, безусловно, заслуживает присуждения искомой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия.

Доктор биол. наук, член-корр. РАН

Ф.Л.Киселёв

Зав. лаборатории молекулярной биологии вирусов
отдела трансформирующих генов опухолей
НИИ канцерогенеза Федерального государственного
бюджетного научного учреждения «Российский онкологический
научный центр им. Н.Н.Блохина»

«Российский онкологический научный центр им. Н.Н.Блохина»
115478 г. Москва, Каширское ш. д.24
тел.: 8(495) 323-57-33; 8(495) 323-58-11
E-mail: flkhpv@yandex.ru

Подпись руки Ф.Л.Киселёва заверяю:

Учёный секретарь НИИ канцерогенеза
ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н.Блохина»



Канд. биол.наук М.В.Гудкова