

ОТЗЫВ
официального оппонента о диссертации
КУЗНЕЦОВА ВИТАЛИЯ ВИКТОРОВИЧА
«Олигонуклеотидные ингибиторы ДНК-метилтрансферазы 1 человека и их
влияние на аберантное гиперметиличрование ДНК в раковых клетках»,
представленной на соискание
ученой степени кандидата биологических наук по специальности
03.01.03 - молекулярная биология

Диссертационная работа В.В.Кузнецова относится к одному из наиболее перспективных и многообещающих направлений современной молекулярной биологии – исследованию роли эпигенетических изменений, в частности роли метилирования ДНК, в патогенезе злокачественных опухолей. Так как метилирование ДНК у эукариот поддерживается ферментом ДНК-метилтрансферазой I, обеспечивающей в процессе репликации молекулы ДНК модификацию ее вновь синтезированной цепи, то весьма актуален вопрос о поиске прямых ингибиторов этого фермента, которые обладали бы не только противоопухолевой активностью, но и при этом умеренно бы воздействовали на нормальные клетки. Именно это направление работ и послужило целью оппонируемой диссертационной работы, направленной на дизайн рекомбинантных молекул, способных эффективно деметилировать аберантно гиперметиличрованную ДНК в раковых клетках (на примере карциномы шейки матки). В связи с этим поиск и создание молекул, позволяющих ингибировать рост злокачественных опухолей, подчеркивает новизну и значимость решаемой диссертантом проблемы. Не вызывает сомнения и актуальность данного направления исследований как в теоретическом, так и практическом плане.

Диссертационная работа хорошо структурирована и включает основные разделы, посвященные обзору литературы по данной области исследований, описанию материалов и методов, а также представление полученных экспериментальных результатов и их обсуждение. Первый раздел диссертационной работы предваряет «Введение», в котором диссертантом четко обозначены актуальность и социальная значимость выбранного направления исследований, определена цель и для ее достижения сформулированы задачи, подчеркнуты научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы. Результаты диссертационной работы достаточно полно и четко отражены в выводах. В «Заключении» диссертантом проанализированы характеристики созданных ингибиторов ДНК-метилтрансферазы I человека, способных подавлять абберантное гиперметиличрование в клетках рака шейки матки. Диссертационная работа написана хорошим языком, прекрасно иллюстрирована и обсуждена на основании анализа работ других исследователей. Список цитируемой литературы составляет 305 источников, основная часть которых (295) представлена работами зарубежных исследователей.

Первая часть диссертации посвящена обзору литературы и включает анализ современного состояния исследований в области представлений о роли эпигенетических изменений в патогенезе злокачественных опухолей, а также поиску методов и подходов для получения высокоэффективных противоопухолевых препаратов. Диссертантом подробно рассмотрены особенности и проблемы, связанные с метилированием ДНК, такие, как роль метилирования у эукариот (и, соответственно, у человека), а также представлены современные молекулярные методы исследования метилирования. В этом разделе диссертационной работы автором сделан особый упор на рассмотрение роли метилирования в онкогенезе у человека и рассмотрены подробно эпигенетические онкомаркеры. Обзор логично структурирован, написан хорошим языком и включает ссылки на 305 источников литературы.

Сильной стороной этого раздела диссертационной работы является удачно выбранный подход изложения огромного числа работ в данном направлении исследований, основанный на представлении современных достижений в исследовании ДНК-метилтрансфераз и биологической роли метилирования ДНК у млекопитающих, а также на анализе современных подходов, позволяющих ингибировать этот процесс. Большое внимание в этом разделе диссертационной работы уделяется критическому анализу современных методов ингибирования ДНК-метилтрансфераз и их практическому приложению для создания высокоэффективных противоопухолевых препаратов. Общая схема, положенная в основу этой части диссертационной работы – скрупулезный анализ достижений современной молекулярной биологии, которые послужили бы обоснованием к разработке новых подходов создания препаратов для лечения и диагностики онкологических заболеваний, в частности карциномы шейки матки.

Вторая часть рецензируемой работы посвящена описанию объектов и методов, используемых при выполнении экспериментов. Для решения поставленных задач автором использованы современные биологические методы молекулярного анализа ДНК, применение которых подчеркивает высокий уровень экспериментальных работ, выполненных диссертантом. Все методы, использованные в работе, адекватны согласно поставленным в работе задачам.

На защиту диссертантом вынесено четыре основных положения, которые убедительно подтверждены экспериментальными результатами, представленными в третьей части диссертационной работы. Общая схема, положенная диссертантом в основу этой части работы, включает дизайн, проектирование и синтез эффективных олигонуклеотидных ингибиторов ДНК-метилтрансферазы I человека, включающих различные одно-, двуцепочечные и шпильчатые структуры с различными по степени метилирования участками узнавания фермента.

В основу дизайна олигонуклеотидов, специфичных к ДНК-метилтрансферазе I человека, положены современные экспериментальные данные и знания о создании высокоэффективных лигандов, накопленные к моменту начала исследований. С учетом этих знаний, были спроектированы три типа олигонуклеотидов, один из которых был представлен серией ДНК-структур, полученных на основе 22-ти звенной последовательности и комплементарной ей

цепи с соответствующими заменами мишени метилирования (цитозина). Диссертантом экспериментально продемонстрированы субстратные свойства созданных синтетических олигонуклеотидных структур, а также оценена их способность ингибировать активность фермента ДНК-метилтрансферазы I. На основании результатов скрининга субстратных/ингибиторных свойств синтетических олигонуклеотидных структур отобраны структуры, максимально проявляющие свои ингибиторные свойства. Диссертантом оценена способность их проникновения в клетки карциномы шейки матки и особенности их локализации, а также проведена оценка цитотоксического эффекта в экспериментах с различными линиями клеток. Полученные результаты свидетельствуют о высоком терапевтическом потенциале созданных олигонуклеотидов, что подтверждалось различиями с контролем на два порядка. В результате проведенных экспериментов диссертантом получены и запатентованы ингибиторы ДНК-метилтрансферазы I человека, способные подавлять абберантное гиперметилирование в клетках рака шейки матки.

Одной из сильных сторон оппонируемой диссертационной работы является блестящее применение и адаптация диссертантом метода, названного авторами «GLAD-ПЦР для анализа статуса метилирования ДНК», предназначенного для оценки эффективности ингибиторов по отношению к клеткам не только разных опухолей, но и в пределах одного типа опухоли, позволяющего установить паттерн метилирования с использованием метилзависимой рестриктазы *GlaI*. Простота, эффективность и гибкость данного метода являются основанием для разработки в дальнейшем на его основе тест-систем для выявления эпигенетических изменений в экспрессии генов-онкомаркеров с целью ранней диагностики онкозаболеваний.

Представленные в работе результаты обладают высокой степенью научной новизны, выводы соответствуют поставленным задачам и согласуются с полученными результатами. Полученные при выполнении работы данные представляют интерес для специалистов, работающих в области молекулярной биологии и онкологии, генной инженерии, генетиков, молекулярных биологов и могут быть использованы в учреждениях РАН и РАМН, на кафедрах генетики и молекулярной биологии университетов. Результаты исследований, полученных при выполнении диссертационной работы, несомненно, найдут применение при чтении различных курсов лекций в различных учреждениях учебного профиля. Автореферат полностью отражает содержание диссертации. Актуальность, научная новизна и практическая значимость выполненной диссертационной работы подтверждается списком научных публикаций и патентов автора, а также представлением на научных конференциях, как российского, так и зарубежного уровней.

В целом диссертационная работа Кузнецова Виталия Викторовича «Олигонуклеотидные ингибиторы ДНК-метилтрансферазы I человека и их влияние на абберантное гиперметилирование ДНК в раковых клетках», является самостоятельным завершенным научным исследованием, выполненным на высоком методическом уровне и вносящим существенный вклад в развитие стратегий противоопухолевых препаратов и диагностических тест-систем. По объему

выполненных исследований, актуальности полученных результатов представленная диссертационная работа полностью соответствует требованиям ВАК о порядке присуждения научных степеней, а ее автор Виталий Викторович Кузнецов несомненно заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальностям: 03-01-03 – молекулярная биология.


Зав. лабораторией биоинженерии растений
Федерального государственного бюджетного
Научного учреждения «Федеральный исследовательский
Центр Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук»
доктор биологических наук, профессор
Елена Викторовна Дейнеко

21 августа 2015 года.



Федеральное государственное бюджетное
научное учреждение «Федеральный исследовательский
Центр Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук»
проспект акад. Лаврентьева, 10
Новосибирск-90, 630090, (383)363-49-63*3204
deineko@bionet.nsc.ru



Данную подпись Дейнеко Е.В.
Заверяю.
Нач. отдела кадров:  Л.А. Савенкова
21.08.2015г.