

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу **Алексеевой Людмилы Александровны** «Механизм подавления опухолевой прогрессии под действием ДНКазы I», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – «биохимия»

### **Актуальность темы исследования.**

В настоящий момент накоплено немало данных о различных характеристиках внеклеточных ДНК (внДНК) крови онкологических больных. Предпринимаются попытки использовать различные характеристики внДНК и последовательности их составе в качестве диагностических и прогностических инструментов. Однако лишь недавно внДНК начали рассматривать как важный агент для процессов метастазирования, и предпринимать попытки использования внДНК как мишень для терапии. В связи с этим становится актуальным вопрос о разработке препаратов на основе ферментов, обладающих ДНКазной активностью.

Работа Алексеевой Л.А. посвящена исследованию фундаментальных механизмов распространения метастазирования и его подавления под действием ДНКазы I, а также поиску молекулярных мишеней ДНКазы I среди циркулирующих внДНК мышей с различными экспериментальными опухолевыми моделями.

### **Научная новизна работы.**

В работе Алексеевой Л.А. впервые показано подавление инвазивного потенциала метастазирующих опухолей меланомы B16 и лимфосаркомы RLS<sub>40</sub> мышей под действием ДНКазы I. Впервые показано, что лечение ДНКазой I коррелирует с деградацией фрагментов онкогенов и фрагментов SINE и LINE элементов в пуле внДНК крови мышей с опухолями различного гистогенеза. Полученные данные позволяют утверждать, ДНКаза I может быть использована в качестве универсального антиметастатического препарата, а также в качестве удобного инструмента для поиска новых маркеров в пуле внДНК при развитии патологических процессов.

Впервые показано, что антиметастатическим потенциалом обладает не только бычья панкреатическая ДНКаза I, но и препарат человеческой рекомбинантной ДНКазы I (Пульмозим™). Учитывая то, что антиметастатический потенциал Пульмозима™ показан на высокоагрессивной модели меланомы, подобный практический результат позволит рекомендовать лицензированный препарат для ускоренных клинических исследований в качестве нового антиметастатического средства.

## **Общая характеристика.**

Диссертация Алексеевой Л.А. имеет традиционную структуру, состоит из Введения, Обзора литературы, Материалов и методов, Результатов и обсуждения, Выводов и Списка цитируемой литературы. Библиография включает 365 источников. Работа изложена на 158 страницах, иллюстрирована 32 рисунками и 15 таблицами. Объем диссертации отвечает необходимым требованиям для квалификационной работы. В работе предоставлена необходимая и достаточная информация о проблематике темы и полученных экспериментальных результатах, также присутствуют разделы с их обсуждением.

Раздел «Введение» содержит полную информацию об актуальности темы исследования и степени ее проработки, об основной цели и задачах работы, научной новизне, теоретической и практической значимости, методах исследования, достоверности полученных данных. Кроме того, во «Введении» перечислены основные положения, выносимые на защиту, отражены данные по апробации, месту выполнения работы и личному вкладу соискателя.

Обзор литературы соответствует теме исследования и исчерпывающе обосновывает ее актуальность. Во вступительной главе Алексеева Л.А. дает краткую хронологию изучения вДНК. Далее дается полное описание объекта исследования как в здоровом организме, так и при развитии патологических процессов. Особый упор автор делает на различиях в профиле вДНК здоровых пациентов и онкологических больных. Автор анализирует гипотезы о значении вДНК в развитии патологических процессов, связанных с канцерогенезом и метастазированием. В заключение автор дает краткую характеристику ДНКазы I как фермента участвующего в биогенезе вДНК и потенциального препарата для лечения заболеваний, связанных с избыточным образованием вДНК. Обзор написан хорошим литературным языком, содержит необходимые научные термины и сокращения.

Глава «Материалы и методы» содержит информацию об использованных в работе реактивах и буферах, оборудовании, плазмидных конструкциях, праймерах для ПЦР, клеточных культурах, лабораторных животных и опухолевых моделях. В достаточной мере описаны традиционные методы молекулярной биологии и биохимии, такие как электрофорез, выделение ДНК из клеток и сыворотки крови, амплификация ДНК с помощью ПЦР. Приведены описания техники исполнения экспериментов с клеточными культурами (*in vitro*) и с лабораторными животными с описанием прививания опухолей и анализа отобранного биологического материала (*in vivo*). Подробно описан протокол конструирования библиотек и подготовка к секвенированию на платформе SOLiD 5.500.

Завершается раздел списком методов статистической обработки данных. Спектр использованных в работе методических приемов и технологий весьма широк и оптимален для решения поставленных задач.

Полученные в ходе работы Алексеевой Л.А. экспериментальные данные подробно описаны в главе «Результаты и их обсуждение», состоящей из пяти основных разделов. Первый раздел посвящен действию ДНКазы I *in vitro*. Во втором разделе автор описывает антиметастатическое действие ДНКазы I на нескольких опухолевых моделях, проводит поиск корреляций между снижением инвазивного потенциала опухолей и изменением соотношения общая концентрация циркулирующих вДНК/ суммарная ДНКазная активность крови.

Третий раздел главы «Результаты и их обсуждение» посвящен конструированию ДНК-библиотек из вДНК крови мышей с карциномой легких Льюис после терапии ДНКазой I и их секвенированию с целью поиска молекулярных мишеней ДНКазы I. Автор получил большое количество данных о фрагментах онкогенов и tandemных повторов в крови животных-опухоленосителей при прогрессировании опухоли, что позволяет заключить о возможности их использования в качестве онкомаркеров. Основным достижением этого раздела работы является выявление в качестве молекулярных мишеней ДНКазы I фрагментов tandemных повторов, а именно SINE и LINE элементов.

В четвертом разделе и автор исследует снижение уровня SINE и LINE элементов в пуле вДНК под действием ДНКазы I на нескольких типах экспериментальных опухолей различного гистогенеза и четкая корреляция с антиметастатическим действием ДНКазы I. Автором впервые на примере SINE и LINE элементов из крови мышей с карциномой легких Льюис показана способность фрагментов tandemных повторов проникать в клетки человека. В пятом, заключительном разделе, представлены результаты антиметастатического действия препарата Пульмозим, представляющего собой рекомбинантную ДНКазу I человека, в сравнении с бычьей панкреатической ДНКазой I.

Представленные научные результаты, несомненно, вносят большой вклад в понимание молекулярных механизмов метастазирования и возможной роли вДНК в этих процессах, а полученные результаты позволяют не только выявить механизм действия ДНКазы I как антиметастатического препарата, но и предложить ряд новых онкомаркеров.

### **Достоверность результатов и обоснованность выводов.**

В работе Алексеевой Л.А. четко определены и обоснованы актуальность исследований, научная новизна, практическая значимость. Основные положения диссертации, выносимые на защиту, нашли отражение в сделанных выводах, отвечающих цели и задачам исследования. Выводы, сделанные в работе на основании анализа полученных результатов, достоверны и логично вытекают из интерпретации экспериментальных данных, а также хорошо согласуются с результатами других исследователей, упомянутых в обзоре литературы и в обсуждении результатов. Материалы диссертации отражены в 3-х печатных работ в рецензируемых журналах, индексируемых в базах данных Web of Science и SCOPUS, 2 из которых представлены статьями в высокорейтинговых международных журналах. Во всех статьях Алексеева Л.А. является первым автором. В дополнение к этому материалы диссертации были доложены на 6 всероссийских и международных конференциях, тезисы докладов опубликованы.

### **Значимость работы.**

В работе Алексеевой Л.А. исследовано подавление опухолевой прогрессии под действием ДНКазы I. Было проанализировано изменение профиля внДНК у мышей-опухоленосителей под действием бычьей панкреатической ДНКазы I и препарата человеческой рекомбинантной ДНКазы I (Пульмозим™). Было обнаружено, что при терапии ДНКазами снижается количество и площадь метастазов, что сопровождается дозозависимым снижением патологически повышенного уровня фрагментов онкогенов и tandemных повторов. Важным результатом является то, что антиметастатическое действие ДНКазы I продемонстрировано на широком спектре опухолей.

Автором выявлен ряд значимых tandemных повторов и онкогенов среди циркулирующих внДНК мышей-опухоленосителей, которые могут быть использованы в качестве потенциальных маркеров для диагностики опухолевых заболеваний, а также мишеней для терапии. Важной является обнаруженная универсальность tandemных повторов SINE и LINE элементов как потенциальных онкомаркеров, что, возможно, позволит использовать их в исследованиях с другими типами опухолей.

Автором впервые продемонстрировано, что специфичные SINE и LINE, полученные из крови мышей с LLC, способны проникать в клетки человека, что свидетельствует о возможности tandemных повторов участвовать в межвидовом переносе ДНК.

### **Замечания и предложения.**

По содержанию и оформлению диссертации принципиальных замечаний нет. Тем не менее, несколько моментов вызывают вопросы или замечания.

1. В некоторых местах количество ДНКазы I указывается в ед.акт., а в некоторых в мг. Было бы удобнее универсализировать обозначения.
2. В результатах частично присутствуют описания методик, которые можно было бы перенести в методическую часть работы. Например, первый абзац на стр. 74, текст на стр. 79 и т.д. Это упростило бы восприятие результатов.
3. На стр. 87 указано, что введение ДНКазы I значительно снижало уровень внДНК в моделях В16 и LLC, но практически не влияло на уровень внДНК на модели RLS<sub>40</sub>. Сделано предположение (стр. 89), что усиленный апоптоз клеток в модели RLS<sub>40</sub> приводит к восполнению уровня ДНК. Можно также предположить, что при этом в кровотоке повышается уровень G-актина, природного ингибитора ДНКаз, что приводит к снижению эффективности действия ДНКазы. Были ли сделаны какие-либо исследования на это тему?
4. По первому выводу. Автором в первом разделе результатов показано, что ДНКазы I снижает жизнеспособность клеток В16 с IC<sub>50</sub> 10.1 ед.акт./мл, поэтому было бы корректнее написать, что «в концентрации не влияющей на жизнеспособность клеток В16 ДНКазы I снижает их миграционную активность».

Необходимо отметить, что эти замечания носят формальный характер, несколько не умаляют высокой научной ценности полученных результатов и завершенности исследования.

### **Заключение.**

Диссертационная работа Алексеевой Людмилы Александровны «Механизм подавления опухолевой прогрессии под действием ДНКазы I», представленная к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – «биохимия», представляет собой завершенное научное исследование, выполненное на высоком уровне, имеющее очевидное научно-практическое значение и добавляющее новое знание в области фундаментальных знаний о процессах метастазирования.

Несмотря на некоторые замечания, которые носят дискуссионный и рекомендательный характер, диссертационная работа Алексеевой Л.А. по актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости отвечает требованиям, установленным Институтом химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН к работам

подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 03.01.04 «биохимия» (биологические науки), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Диссертация оформлена согласно Приложениям № 5, 6 Положения о диссертационных советах Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Автор диссертации, Алексеева Л.А., заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 «биохимия» (биологические науки).

9 декабря 2020

Главный научный сотрудник  
Лаборатории конформационного полиморфизма белков в норме и патологии  
Федерального государственного бюджетного учреждения науки  
Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН

д.б.н.

 В.А. Митькевич

Адрес: 119991, Москва, ул. Вавилова, 32  
Рабочий телефон: +74991359824  
e-mail: mitkevich@gmail.com

Подпись д.б.н. В.А. Митькевич заверяю:  
Ученый секретарь ИМБ РАН  
к.в.н.



А.А. Бочаров