

## ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук Е.Ю. Рыковой на диссертацию Алексеевой Людмилы Александровны «Механизм подавления опухолевой прогрессии под действием ДНКазы I», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия

**Актуальность проведенного исследования.** Задача раннего выявления и успешного лечения онкологических заболеваний остается одной из важнейших социально значимых задач медицины и здравоохранения. Даже в период распространения новой вирусной инфекции злокачественные новообразования не теряют лидирующих позиций по заболеваемости, потери трудоспособности и смертности в современном обществе. Опухоли многолики и уникальны даже для одинаковой тканевой локализации, одного гистологического типа, что определяет проблемы диагностики и выбора тактики лечения. В то же время у них есть универсальные признаки и свойства, которые могут оказаться общими мишенями для терапии разных типов рака. В настоящее время накоплены данные о внеклеточных нуклеиновых кислотах (внНК), которые циркулируют в крови и могут быть как индикаторами, так и участниками злокачественной трансформации. Предположение об участии внДНК в экспансии опухоли косвенно подтверждается терапевтическим эффектом экзогенного ДНК-гидролизующего фермента (ДНКазы I) при раке, в частности, подавлением метастазирования. Молекулярные механизмы действия ДНКазы I на трансформированные клетки остаются малоизученными, при этом перспектива практического использования фермента в качестве потенциального терапевтического средства определяет актуальность их изучения. В связи с этим исследование, проведенное Л.А. Алексеевой, является значимым как для расширения фундаментальных представлений о патогенезе рака, так и для практической медицины, учитывая тот факт, что использование ДНКазы I в форме лекарственного средства Пульмозим™ одобрено для лечения ряда заболеваний.

В работе Л.А. Алексеевой решена задача, которая находится на стыке фундаментальной медицины и биологии: изучение антиметастатического потенциала бычьей панкреатической ДНКазы I на экспериментальных опухолевых моделях и поиск ее молекулярных мишеней среди циркулирующих внДНК крови. Работа выполнена с использованием адекватных и современных методов и подходов. Получены данные о влиянии ДНКазы на клетки опухоли при культивировании, а также на развитие опухоли из этих же клеточных линий в организме. Исследование проведено на мышинных моделях рака, которые являются аналогами болезней человека, а именно, аденокарциномы легкого, меланомы и лимфосаркомы. Сравнение в одном исследовании трех типов опухолей разного генеза и тканевой локализации позволяет говорить как об универсальности противоопухолевого действия фермента, так и об особенностях ответа со стороны опухоли определенного типа.

**Достоверность полученных результатов** определяется использованием разнообразных методических подходов, значительным объемом экспериментальных данных, полученных в результате нескольких биологических повторов с последующей статистической обработкой. Выводы представляются обоснованными, поскольку сделаны на основе значительного количества экспериментальных данных, которые приведены в диссертации.

**Структура диссертационной работы.** Диссертация Алексеевой Л.А. имеет традиционную структуру, состоит из Введения, Обзора литературы, Материалов и методов, Результаты 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, полученных 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. Раздел «Обзор литературы» полностью соответствует теме работы и содержит сведения, необходимые для обоснования своевременности исследования и определения значимости результатов автора. Во вступительной главе автор обсуждает основные этапы изучения внДНК как биологического объекта. В последующих главах приведены известные характеристики состава внДНК здоровых доноров и онкологических больных, дано современное представление о механизмах генерации, формах циркуляции внДНК, их возможной биологической роли. В обзоре обсуждаются актуальные концепции участия внДНК в патогенезе рака, предполагаемая роль в формировании метастазов при прогрессии онкологических заболеваний. Важной частью обзора является описание исследований, посвященных использованию экзогенной ДНКазы I как терапевтического агента при раке, в том числе описаны немногочисленные работы, говорящие об антиметастатическом потенциале фермента. Обзор хорошо читается, четко структурирован и дополнен иллюстративным материалом.

В главе «Материалы и методы» подробно описаны использованные в работе оборудование, реактивы, клеточные культуры, модели опухолей на мышах. Этот раздел дает представление о разнообразии использованных в работе методов молекулярной, клеточной биологии и биохимии, как выделение ДНК из клеток и биологических жидкостей, анализ ДНК методом электрофореза, ПЦР в режиме реального времени. Приведены протоколы работы с клеточными культурами (*in vitro*), лабораторными животными, прививания опухолей и анализа отобранного биологического материала (*in vivo*). Подробно описан протокол получения библиотек для секвенирования на платформе SOLiD 5.500. Завершается раздел кратким перечнем использованной статистики. Спектр использованных в работе методических приемов и технологий является необходимым и достаточным для решения поставленных задач.

В разделе «Результаты и обсуждение» автор проводит анализ полученных данных, который сопровождается обсуждением. Действие ДНКазы I на жизнеспособность, миграционную активность было определено на линии клеток меланомы B16, которая при культивировании является прикрепляющейся. Изучено влияние фермента на количество внДНК, которое присутствует во внеклеточной среде и на поверхности клеток линий B16, LLC и RLS<sub>40</sub>. Внутримышечное введение ДНКазы I определено как наиболее эффективное для терапевтического действия *in vivo* по сравнению с внутривенным и внутрибрюшинным введением. Выявлены общие закономерности и особенности действия фермента при сравнении линий клеток *in vitro*, и при формировании опухоли *in vivo*. Развитие опухолей разного генеза приводит к появлению разного количества внДНК, которое выявляется в плазме крови, характеризуется разным уровнем снижения собственной ДНКазной активности крови и восстановления этой активности после введения экзогенного фермента. Например, при сравнении лимфосаркомы и меланомы показана различная зависимость

антиметастатического эффекта под действием ДНКазы I – при лимфосаркоме RLS<sub>40</sub> мыши наблюдается более выраженное подавление образования метастазов, чем при меланоме B16. При этом при лимфосаркоме RLS<sub>40</sub> уровень вДНК в крови не снижается под действием фермента, что ставит вопрос о других механизмах терапевтического действия ДНКазы, кроме влияния на количество циркулирующих вДНК.

В настоящей работе Л.А. Алексеевой проведено также исследование рекомбинантной ДНКазы I человека в составе лекарственного препарата Пульмозим™, что важно для оценки перспективы применения зарегистрированного лекарственного средства. Показано, что действие рекомбинантной ДНКазы I человека на миграционную активность опухолевых клеток является более выраженным по сравнению с панкреатической ДНКазой быка. Антиметастатическое действие препарата Пульмозим™ в модели *in vivo* было сопоставимым с действием панкреатической ДНКазы I.

Анализ гистологических срезов селезенки, тимуса позволил выявить изменение морфофункционального состояния органов иммунной системы (ИС) мышей с меланомой B16 под действием ДНКазы I. В результате автор приходит к выводу о том, что происходит неспецифическая активация ИС, которая играет роль в терапевтическом действии ДНКазы I. Вызывает **вопрос** отсутствие в этих экспериментах двух важных групп сравнения – это контрольные мыши без опухоли при введении ДНКазы I и без введения фермента, которые необходимы для понимания действия фермента на состояние ИС в норме. По этому **вопросу** необходимы комментарии автора.

Анализ собственных результатов позволяет автору предполагать, что мишенью ДНКазы I являются опухоль-ассоциированные вДНК. Это определяет ход дальнейшей работы, направленной на поиск тех участков вДНК крови, которые могут быть наиболее подвержены действию фермента. В работе Л.А. Алексеевой получены новые данные о потенциальных мишенях фермента в составе вДНК, циркулирующих в крови модельных мышей. Для этого проведен масштабный сравнительный анализ на платформе SOLiD 5.500 вДНК крови здоровых мышей, и мышей с привитой карциномой Льюис LLC без лечения и после лечения ДНКазой I. Результаты сравнительного анализа могли быть более полными в случае получения данных о влиянии ДНКазы I на вДНК здоровых мышей, однако такая группа в исследование не была включена. В связи с этим остается неизвестным, какие мишени во вДНК в норме преимущественно подвержены действию экзогенного фермента. Также следует отметить, что для выделения необходимого количества вДНК объединяли сыворотку крови от всех мышей, входивших в группу. Поэтому результаты говорят об усредненных значениях по группам, при этом индивидуальные различия внутри группы могли внести вклад в эти значения, что определяет необходимость верификации данных.

В результате анализа данных секвенирования во вДНК были выявлены дифференциально представленные последовательности при сравнении между группами. Автор уделила особое внимание онкогенам и повторяющимся последовательностям. Установлено, что представленность онкогенов *Hmga2*, *Fos*, *Myc*, *N-ras* и *Jun* увеличивается у мышей с опухолью до лечения, и снижается после обработки ДНКазой I. Результаты были валидированы для гена *Myc*, уровень которого возрастал в 15 раз по итогам секвенирования, с использованием ПЦР в режиме реального времени. По данным ПЦР увеличение количества гена *Myc* было трехкратным при развитии опухоли по сравнению с контролем, и снижение при введении ДНКазы I также оказалось трехкратным.

Проведенный анализ данных показал, что при развитии опухолей значительно меняется количество tandemных повторов. Из 250 типов проанализированных повторов, которые различались между группами, представленность 158-ми типов была увеличена у экспериментальных мышей по сравнению со здоровыми мышами. Из 19 типов повторов В-семейства, имеющих высокую гомологию с ALU-повторами человека (SINE элементы), повторы подсемейства B1 были в два раза выше представлены у мышей с карциномой Льюис, и показали снижение представленности до «здорового» уровня под действием ДНКазы I. Представленность большинства подсемейств ERVB, L1 и RLTR, увеличивалась при развитии LLC и уменьшалась после лечения ДНКазой I до уровня, сопоставимого с уровнем здоровых мышей. С использованием метода ПЦР в режиме реального времени на моделях трех опухолей (B16, LLC и RLS<sub>40</sub>) выявлено увеличение представленности SINE и LINE элементов в сыворотке крови по сравнению с мышами без опухоли. Количество повторов снижалось под действием ДНКазы I, что коррелировало со снижением количества метастазов в этих моделях. Эти результаты позволяют предполагать участие SINE- и LINE- содержащих фрагментов во вДНК крови в патогенезе рака, в частности, в процессах метастазирования.

Интересные результаты получены в экспериментах по культивированию клеток эпидермоидной карциномы человека KB-3-1 в присутствии вДНК сыворотки крови здоровых мышей и мышей с аденокарциномой Льюис. Получены данные о существенном увеличении уровня экспрессии определенных последовательностей SINE и LINE элементов мыши в ДНК, выделенной из инкубированных клеток человека, что позволяет автору сделать вывод о проникновении вДНК мыши в клетки человека KB-3-1. Возникает **вопрос** о том, что такой результат не является прямым доказательством переноса внеклеточного генетического материала внутрь клеток. Следует отметить, что уровень экспрессии выявляемых фрагментов в ДНК клеток человека KB-3-1 не равен нулю, есть фоновый уровень. В связи с этим можно предложить в качестве объяснения увеличение количества повторов собственной ДНК, имеющих гомологию с B1\_mus1 и L1\_mus1, под действием вДНК мыши в течение 3-х дней культивирования. Более прямым доказательством проникновения экзогенных молекул ДНК внутрь клеток мог быть анализ фрагментов вДНК, содержащих некоторые метки, например, более низкий уровень метилирования исследуемых внеклеточных повторов, который характерен для повторяющихся последовательностей опухолевых клеток при глобальном деметилировании генома.

Каждая глава раздела «Результаты» сопровождается Заключением, которое представляет краткое обсуждение и резюме представленных данных, и формулируются «Выводы». Диссертационная работа Л.А. Алексеевой характеризуется хорошим качеством оформления. Работа содержит незначительное количество неудачных выражений, неточностей и опечаток, однако некоторые погрешности оформления не снижают высокого уровня представленной работы. Возникшие при прочтении диссертации **вопросы** носят дискуссионный характер и не влияют на общее впечатление о представленной работе. По результатам исследования опубликованы 3 статьи в рецензируемых журналах, сделаны сообщения на международных и всероссийских конференциях, тезисы которых опубликованы в сборниках трудов конференций. Автореферат отражает основное содержание диссертационного исследования.

Полученные Л.А. Алексеевой результаты достоверны, выводы, заключающие диссертацию, корректны, обоснованы, и соответствуют поставленным задачам. Работа представ-

ляет собой завершённое исследование, выполненное на высоком методическом уровне. Представленная работа носит не только квалификационный характер, а имеет самостоятельное значение для дальнейшего развития исследований действия экзогенной ДНКазы I на прогрессию опухоли, что важно для расширения представлений о механизмах патогенеза рака и формирования новых подходов к лечению.

Таким образом, по актуальности темы, объёму, новизне полученных результатов и их научной и практической значимости представленная диссертация Л.А. Алексеевой отвечает требованиям, установленным Институтом химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 03.01.04 – биохимия, а также критериям, определённым 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 Людмила Александровна, без сомнения, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

Доктор биологических наук,  
ведущий научный сотрудник  
лаб. молекулярной медицины ИХБФМ СО РАН

Е.Ю. Рыкова

Подпись д.б.н., в.н.с. Е.Ю. Рыковой заверяю:  
Ученый секретарь ИХБФМ СО РАН  
канд. хим. наук



П.Е. Пестряков

630090, г. Новосибирск, пр. Ак. Лаврентьева, 8  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт химической биологии и фундаментальной медицины  
Сибирского отделения Российской академии наук  
ИХБФМ СО РАН, Тел.: +7 (383) 363-51-44  
E-mail: [rykova.elena.2014@gmail.com](mailto:rykova.elena.2014@gmail.com)

9.12.2020