

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Коваль Ольги Александровны на тему «Разработка новых подходов противоопухолевой терапии и моделей для анализа их эффективности», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.03 — молекулярная биология.

Актуальность темы исследования

Злокачественные новообразования являются ведущей причиной смертности в развитых странах мира и их частота неуклонно увеличивается с увеличением средней продолжительности жизни. Пятилетняя выживаемость при метастазирующих карциномах может составлять менее 50% а медиана выживания пациентов с такими злокачественными заболеваниями, как трипл-негативный рак молочной железы или рак панкреато-дуоденальной зоны составляет 2 года. Тяжесть клинических проявлений, а также отсутствие эффективных методов лечения и профилактики множественных метастазов делает крайне актуальной разработку и испытание новых терапевтических технологий. Довольно перспективными технологиями, активно исследуемыми в последние десятилетия, является применение генно-инженерных онколитических вирусов, адоптивная иммунотерапия с помощью генетически усиленных цитотоксических клеток (CAR-T, CAR-NK, TILs и др.) а также комбинирование этих подходов. В последние годы, в связи с развитием мультидисциплинарных исследований всё большее внимание уделяется биофизическим подходам, в частности, применению холодной плазмы для индукции гибели опухолевых клеток.

Очевидно, что доклинические испытания способов профилактики и терапии злокачественных образований могут быть эффективны только при наличии адекватных моделей, характеризующихся генетическим и эпигенетическим подобием первичным и/или рекуррентным карциномам. Несмотря на очевидность этого тезиса, существующие модели в подавляющем большинстве применяют библиотечные линии опухолей человека, полученные десятилетия назад. Очевидно, что по своему паттерну экспрессии и репертуару рецепторов эти линии лишь очень отдаленно напоминают первичные опухоли. Вот почему в настоящее время очень актуально исследование первичных опухолей у конкретных пациентов, вплоть до создания персонифицированных «аватаров» опухоли у иммунодефицитных животных и в системах *«tumor on chip»*.

Общая характеристика диссертации

Диссертация О.А. Коваль написана на русском языке и оформлена в виде доклада. Она состоит из введения, формулирования целей и задач, семи положений, вынесенных на защиту, описания результатов, обсуждения, выводов и списка публикаций по теме диссертации. Диссертация изложена на 41 странице, иллюстрирована 25 рисунками, содержит 6 таблиц.

Цель работы сформулирована как «разработка новых молекулярно-биологических и физико-химических подходов для противоопухолевой терапии на основе лактапина и технологии холодной плазменной струи, а также создание клеточных и опухолевых моделей для тестирования их активности *in vitro* и *in vivo*».

Задачи, поставленные диссертантом для достижения цели, включают: 1) получение новых клеточных и опухолевых моделей для тестирования активности противоопухолевых и антиметастатических препаратов, в том числе таргетных; 2) исследование особенностей индукции клеточной гибели аналогом лактапина RL2. Исследовать цитотоксический, противоопухолевый и антиметастатический потенциал препаратов на основе лактапина на экспериментальных опухолевых моделях; 3) разработку противоопухолевого подхода с использованием холодной плазменной струи. Решение поставленных задач отражено в Результатах и в Выводах, сгруппированных в четыре группы: выводы по созданию опухолевых моделей; выводы по исследованиям механизмов противоопухолевой активности рекомбинантного аналога лактапина RL2; выводы по испытаниям потенциальных противоопухолевых препаратов, содержащих RL2, EL1 и вывод исследования противоопухолевых эффектов холодной плазменной струи.

Научная новизна и практическая значимость диссертации

Основным в научной новизне работы является то, впервые выявлен потенциальный механизм индукции клеточной гибели опухолевых клеток рекомбинантным аналогом лактапина RL2 и идентифицирован основной партнер RL2 среди белков в клетке – митохондриальный белок TOM70. Показано, что RL2 кратковременно индуцирует аутофагию/митофагию в опухолевых клетках и вызывает несогласованную регуляцию генов каскада NF-κB. Впервые проведено комплексное исследование противоопухолевой и антиметастатической активности препаратов на основе аналогов лактапина — рекомбинантного вируса осповакцины VV-GMCSF-Lact, несущего трансгены лактапина и ГМ-КСФ и модифицированной НК-клеточной линии человека YT – Cyto-CAR-YT-Lact, продуцирующей

функциональный CAR против PSMA и несущей делецию гена Shp-2, и трансген, кодирующий аналог лактапина EL1.

Научно-практическая значимость работы заключается в том, что ее результаты могут быть применены для разработки персонифицированных методов опухолевой терапии, создания новых онколитических вирусов и CAR-T клеток, а также для фундаментальных исследований опухолевой прогрессии.

Достоверность и обоснованность результатов исследования

Достоверность полученных результатов исследования подтверждается большим объёмом экспериментальных исследований, выполненных диссертантом и представленных в 21 публикации по теме диссертации. Примененные в работе методы и технологии являются современными и адекватны поставленной цели и задачам. Достоверность статистической обработки не вызывает сомнений.

Полученные в работе результаты были неоднократно доложены автором на российских и международных научных конференциях. По теме диссертации опубликована 21 статья в российских и зарубежных научных журналах, включая высокорейтинговые журналы, входящие в Q1. При непосредственном участии автора диссертации получено 6 патентов Российской Федерации.

Замечания

1. В разделе результатов, посвященном созданию линий опухолевых клеток большое значение уделено методу импульсной гипоксии. Если я правильно понял логику автора, применение этой технологии индуцирует мезенхимально-эпителиальную трансформацию и способствует появлению метастазирующих клонов РМЖ. Вместе с тем, в автореферате я не обнаружил результатов экспериментов *in vivo*, это подтверждающих. В этом же разделе описывается метастазирующая линия BrCCh4e, но также не приводится никаких экспериментальных данных, подтверждающих метастатический характер опухоли.
2. Не вполне понятна логика создания PSMA-положительной опухолевой линии на базе клеток BrCCh4e-134 рака молочной железы. Если идея в том, чтобы исследовать, как гиперпродукция PSMA влияет на профиль метастазирования, где эксперименты по сравнению метастазирования PSMA+BrCCh4e-134 с исходной линией BrCCh4e-134?
3. Результаты исследования терапии PSMA+BrCCh4e-134 с помощью модифицированной NK-клеточной линии Cyto-CAR-YT-Lact представлены недостаточно подробно. Каким методом оценивалось метастазирование? В

каких органах обнаруживались метастазы? (какова доля костных, висцеральных метастазов?). Каковы результаты лечения мышей с опухолью PSMA+BrCC₄e-134 с помощью контрольных CAR-NK (Cyto-CAR-YT), не экспрессирующих лактаптин?

4. Первая часть диссертации посвящена созданию новых линий опухолевых клеток РМЖ и эндометрия. Линии созданы, охарактеризованы, банкированы. Всё замечательно. Почему последующие *in vivo* эксперименты по оценке противоопухолевой эффективности рекомбинантных аналогов лактаптина и онколитических вирусов VVG_{MCSF}-dGF и VV-G_{MCSF}-Lact, экспрессирующих лактаптин сделаны на библиотечных линиях (аденокарцинома человека MDA-MB-231, рабдомиосаркома мыши MX-7, лимфосаркома RLS, гепатокарцинома мыши ГА1)? Логика работы была бы более полной, если бы во всех этих экспериментах были бы дополнительные группы животных с ксенографтами полученных метастазирующих опухолевых линий.
5. Эксперименты с холодной плазменной струей выглядят весьма впечатляюще, однако, не оставляет ощущение «бантика», привешенного к основной работе. Почему в качестве контрольных клеток в эксперименте *in vitro* взяли НЕК293 (модифицированная аденовирусным геномом культура эмбрионального почечного эпителия) а не нормальные клетки (например, первичные фибробласты?). Обычно опухолевые клетки более резистентны ко всем физико-химическим факторам, чем нормальные клетки. Каков механизм избирательного действия облучения ХПС на опухолевые клетки А431?
6. Автор вводит новую аббревиатуру – «ЗОМЖ» для обозначения рака молочной железы. Чем плоха общеизвестная аббревиатура – «РМЖ»?

Перечисленные замечания являются либо методическими/оформительскими, либо имеют дискуссионный характер и не влияют на общее положительное впечатление от диссертации и на научно-практическую ценность полученных в работе результатов.

Заключение

На основе всего вышеизложенного можно сделать вывод, что диссертационная работа Коваль Ольги Александровны является цельным завершённым научным исследованием, решающим комплексную проблему разработки инновационных способов персонифицированной терапии опухолей,

полностью соответствует требованиям и критериям, установленным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, предъявляемым к диссертациям, представленным на соискание ученой степени доктора биологических наук. Диссертационная работа в виде научного доклада оформлена в соответствии с Приложениями № 5 и 6 Положения о диссертационных советах Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. а сама Коваль Ольга Александровна, безусловно, заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.03 - молекулярная биология.

Баклаушев Владимир Павлович



12.08.2021

Заместитель генерального директора по научной работе и медицинским технологиям, доктор медицинских наук

ФГБУ "Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий ФМБА России" (ФГБУ ФНКЦ ФМБА России)

Почтовый адрес учреждения: 115682, г. Москва, Ореховый бульвар д. 28

Телефон: +74953956207

E-mail: info@fnkc-fmba.ru

Подпись Баклаушева Владимира Павловича

Заверяю:

Заместитель исполнительного директора

По управлению персоналом



Т.М. Ильина