

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу

Коваль Ольги Александровны

**«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 исследования

Диссертационная работа Коваль О. А. посвящена созданию способов терапии онкологических заболеваний, основанных на подходах, отличных от традиционной химиотерапии и лучевой терапии — использовании цитотоксичных пептидов, онколитических вирусов и холодной плазмы, а также получению клеточных моделей, пригодных для исследования эффективности и селективности как этих, так и других видов противоопухолевой терапии.

Современные молекулярно-биологические подходы привели к пониманию того, что онкологические заболевания отличаются большим разнообразием механизмов, приводящих к возникновению фенотипа злокачественной опухоли. В этих процессах большую роль играют как генетические события внутри опухолевых клеток и их предшественников, так и взаимодействие опухоли с микроокружением, гормональные и нейрогормональные стимулы. Неселективная химиотерапия и лучевая терапия сопряжены с высоким уровнем побочного действия, что не позволяет использовать их с интенсивностью, необходимой для полного элиминирования всех опухолевых клеток. Поэтому будущее противоопухолевой терапии видится, во-первых, в развитии аналитических инструментов, позволяющих быстро и надежно выявлять «слабые места» конкретной опухоли у конкретного пациента, и во-вторых, в максимальной специализации терапевтических агентов для их селективного поражения.

В диссертационной работе Коваль О. А. развиваются несколько современных терапевтических и аналитических подходов, интегрированных в единую стратегию. Разрабатываются клеточные модели рака эндометрия и рака молочной железы для тестирования активности противоопухолевых и антиметастатических препаратов. Подробно исследуются механизмы цитотоксичного действия противоопухолевого пептида — лактапина, и предлагаются несколько вариантов его использования, в том числе основанных на платформах клеточной и вирусной терапии. Наконец, предпринимается попытка исследования механизмов действия холодной плазмы как селективного онколитического физико-химического фактора.

Структура и содержание работы

Диссертационная работа Коваль О. А. представлена в виде научного доклада и сопровождающего его автореферата. В связи с этим обзор литературы и подробное описание экспериментальных методов как таковые в диссертации отсутствуют; экспериментальные методы на должном уровне описаны в публикациях соискателя по теме диссертации. Автореферат хорошо структурирован и состоит из общей характеристики работы, описания содержания работы, заключения, выводов и списка публикаций. Автореферат изложен на 41 странице, проиллюстрирован 25 рисунками, содержит 6 таблиц.

В первой части диссертант обосновывает актуальность проблемы, формулирует цель и задачи исследования, суммирует научную новизну, теоретическую и практическую значимость полученных результатов, определяет положения, выносимые на защиту, описывает свой личный вклад в выполнение работы и указывает мероприятия, на которых были апробированы ее основные результаты.

Собственно описание работы разделено на три части. Первая часть посвящена разработке клеточных моделей для тестирования активности противоопухолевых и антиметастатических препаратов, в том числе

таргетных. В современных реалиях при испытаниях разных видов терапии всегда стоит проблема выбора между хорошо охарактеризованными и менее затратными универсальными клеточными моделями и пациент-специфичными моделями, которые лучше отражают индивидуальные особенности опухоли, но в целом более дороги и не столь подробно изучены. Поэтому арсенал доступных клеточных линий постоянно нуждается в расширении и пополнении. В работе описывается получение из отдельных пациентов нескольких линий клеток рака эндометрия и рака молочной железы и характеристика фенотипа этих клеток. Одна из этих линий депонирована в Специализированной коллекции культур клеток позвоночных Российской коллекции клеточных культур. Разработан метод «импульсной гипоксии» для индукции мезенхимально-эпителиального перехода в фибробластоподобных клетках. На мышах показана туморогенность некоторых полученных линий и способность одной из них к метастазированию. На основе этой линии создана трансгенная метастазирующая клеточная линия, экспрессирующая простатический специфический мембранный антиген. Полученные в работе линии использованы для оценки их чувствительности к канцерогенам, химиотерапевтическим и иммуномодулирующим агентам, что открывает возможность их использования в качестве инструмента для тестирования новых форм противоопухолевой терапии.

Вторая, самая обширная часть работы, посвящена исследованию (в том числе с использованием моделей, полученных в первой части) рекомбинантного лактапина — цитотоксического пептида, представляющего собой фрагмент κ-казеина. С фундаментальной точки зрения значительный интерес представляет анализ механизмов цитотоксического действия лактапина, которые, как оказалось, значительно отличаются от механизмов действия известных пептидов, токсичных для раковых клеток — цекропинов, циклотидов, ауреина, аллоферона и т. п. В работе показывается, что лактапин нарушает регуляцию каскада NF-κB, что

способствует развитию апоптоза. Однако на ранних стадиях воздействия в опухолевых клетках активируется аутофагический каскад, но далее события сдвигаются в пользу апоптоза. Комбинация лактапина и ингибирования аутофагии вызывает синергичный цитотоксический эффект. Идентифицированы внутриклеточные белки, взаимодействующие с лактапином, значительная часть которых оказалась митохондриальной природы, что позволило диссертанту сформулировать общую схему регуляции лактапин-индуцированных процессов аутофагии, митофагии и апоптоза в опухолевой клетке. Установлено, что гибель опухолевых клеток под влиянием лактапина является иммуногенной. Значительные усилия во второй части работы были направлены на испытание различных способов применения лактапина для противоопухолевой терапии: исследовано его действие в комбинации с химиопрепаратами, показана антиметастатическая активность лактапина в липосомальной форме, создана и испытана генноинженерная конструкция для продукции и секреции лактапина эукариотическими клетками. В части работы, которая может стать основой для применения лактапина в персонализированной терапии, соискателем проведены исследования по повышению цитотоксической активности NK-клеток, продуцирующих химерные антигенные рецепторы, за счет секреции этого пептида, а также подробно охарактеризовано онколитическое действие рекомбинантных вирусов осповакцины, несущих трансген лактапина.

Наконец, в третьей части работы исследуется противоопухолевое действие холодной плазменной струи. Физические факторы, влияющие на биологические объекты, всегда были менее трактуемыми, чем химические, и лишь в наши дни появляются способы изучения многоуровневых процессов, протекающих в клетках человека под их действием. В диссертации показано, что облучение холодной плазменной струей вызывает иммуногенную клеточную гибель в опухолевых клетках в основном за счет обильной продукции гидроксильных радикалов над поверхностью мишени. Эту часть работы можно рассматривать как пилотную, способную дать толчок новой

научной теме с высоким потенциалом применения в области терапии онкологических заболеваний.

В целом поставленные в работе задачи решены, выносимые на защиту положения аргументированы. Диссертантом проведена впечатляющая по масштабу работа, результаты которой должным образом опубликованы и отражены в научном докладе и автореферате. Предложены перспективы развития полученных результатов и методик.

Замечания по диссертационной работе

Замечания, которые можно сделать, немногочисленны и в основном вызваны формой представления в виде научного доклада, неизбежно менее детального, чем диссертационная работа традиционного вида.

- 1) Не вполне понятен смысл исследования действия канцерогенов (на самом деле — одного канцерогена, бенз[*a*]пирена) на полученные клеточные линии рака эндометрия и рака молочной железы. На с. 12 автореферата указано, что интерес представляло потенциальное связывание бенз[*a*]пирена с эстрогеновыми рецепторами, однако в таком случае следовало бы характеризовать его не как «канцероген», а как эндокринный разрушитель и сравнивать его действие с действием других эндокринных разрушителей. Вне такого контекста эта часть работы подвисает в воздухе.
- 2) Для анализа кривых выживаемости (рис. 13, 14, 15, 23) обычно используют оценку Каплана–Мейера, а не критерий χ^2 , как указано на подписи к рис. 13 и 14. Критерий χ^2 , вообще говоря, неприложим для сравнения полных кривых выживаемости (хотя и может использоваться для сравнения в одной временной точке), поскольку события для одной и той же группы в разное время не являются независимыми.
- 3) Чем объясняется выбор MDA-MB-231 как основной клеточной линии для исследования механизма действия лактапина? Известно, что эти клетки изначально отличаются измененной регуляцией аутофагии и

повышенной проницаемостью митохондриальных мембран (см., напр., Tu *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* **1807**:1125-32, 2011), что может сказаться на применимости полученных результатов для других типов опухолевых клеток.

- 4) Никак не обсуждается примечательный результат (рис. 16), что цитотоксичность секретируемого пептида EL1 заметно выше, чем у рекомбинантного пептида RL2, несмотря на идентичность их аминокислотных последовательностей. Не говорит ли это о том, что в клетках человека EL1 подвергается посттрансляционной модификации? В таком случае следовало бы приложить усилия для их идентификации, поскольку они, очевидно, будут влиять на свойства лактапина как фармакологического агента. На этом же рисунке столбики, соответствующие EL1, расположены в порядке увеличивающихся концентраций, а RL2 — почему-то в обратном порядке, что затрудняет визуальное сравнение частей графиков.
- 5) Раздел, посвященный цитотоксичному действию холодной плазменной струи, во многом выиграл бы, если бы в него были включены данные об анализе состава плазмы и среды, на которую она действует. В текущем варианте эти данные ограничены утверждениями о наличии [•]ОН-радикалов в спектре газовой фазы, однако цитотоксичным действием обладают и другие активные формы кислорода и азота, генерируемые в холодной плазме. Кроме того, состав радикалов, очевидно, должен меняться при взаимодействии струи плазмы с водной средой.
- 6) На с. 33 автореферата клетки НЕК293 названы клетками эмбриональной почки. По современным представлениям, основанном на транскриптомном профилировании разных линий, производных от изначального клона НЕК293, они происходят из эмбрионального надпочечника.

Степень обоснованности и достоверность научных положений и выводов

Представленные в работе результаты свидетельствуют о том, что научные положения и выводы полностью обоснованы и достоверны. Необходимая статистическая обработка проведена. Выводы работы лежат в рамках современного понимания процессов, происходящих в опухолевых клетках при их взаимодействии с терапевтическими агентами. Материалы диссертационной работы отражены в 27 публикациях: в 21 статье в рецензируемых изданиях (7 в российских и 14 в международных научных журналах) и 6 патентах РФ.

Научная новизна и научно-практическая значимость полученных результатов

Работа выполнена в очень актуальной области, частично — на стыке научных дисциплин. Представленное автором исследование вносит существенный вклад в дальнейшее развитие методов персонализации противоопухолевой терапии. Получены многочисленные данные о механизмах действия новых классов противоопухолевых агентов, созданы и тщательно охарактеризованы новые клеточные линии для анализа как этих, так и более традиционных средств лечения онкологических заболеваний.

Общее заключение

Сделанные замечания по содержанию и оформлению работы не умаляют ее достоинств и не влияют на выводы, которые обоснованы и не вызывают сомнения. Содержание автореферата полностью соответствует основным положениям научного доклада и опубликованных автором работ по данному вопросу.

Все вышеизложенное позволяет заключить, что диссертационная работа Коваль Ольги Александровны «Разработка новых подходов противоопухолевой терапии и моделей для анализа их эффективности»

является цельным завершенным научным исследованием, полностью соответствует требованиям, 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 учёной степени доктора 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. Коваль Ольга Александровна заслуживает присуждения искомой ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

Заведующий лабораторией белковой инженерии
Федерального государственного автономного
образовательного учреждения высшего образования
«Новосибирский национальный исследовательский
государственный университет», доктор
биологических наук, доцент, профессор РАН, член-
корреспондент РАН

Жарков Дмитрий Олегович

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет» (НГУ)

Адрес: 630090, Новосибирская область, г. Новосибирск, ул. Пирогова, 2

Телефон: (383) 363-40-00

Факс: (383) 363-42-80

Эл. адрес: rector@nsu.ru

Подпись Жаркова Дмитрия Олеговича заверяю

Ученый секретарь Федерального государственного
автономного образовательного учреждения высшего
образования «Новосибирский национальный
исследовательский государственный университет»

к. х. н.

12 мая 2021 г.



Тарабан Е. А.