

«УТВЕРЖДАЮ»

Врио директора Федерального государственного
бюджетного научного учреждения «Научно-
исследовательский институт фундаментальной и
клинической иммунологии» (НИИФКИ)

д.м.н., профессор

Сенников Сергей Витальевич



03 апреля 2018 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации - Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» - на диссертационную работу Мироновой Надежда Львовны «Механизмы подавления прогрессии экспериментальных опухолей под действием дендритных клеток и природных нуклеаз», представленную к защите в диссертационный Совет по защите кандидатских и докторских диссертаций (Д 003.045.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН) на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия

Актуальность темы диссертационной работы

Диссертационная работа Мироновой Н.Л. посвящена исследованию противоопухолевой активности природных нуклеаз и дендритных клеток (ДК). Злокачественные опухоли являются одной из ведущих причин заболеваемости и смертности во всем мире. Поэтому экспериментальное обоснование новых стратегий в лечении онкопатологии является безусловно актуальным научным направлением. Опухоль-ассоциированные нуклеиновые кислоты играют важную роль в канцерогенезе и метастазировании. Эти факты позволяют по-новому взглянуть на ферменты с нуклеазной активностью, как возможные противоопухолевые и антиметастатические агенты. Так, снижение концентрации или изменение профиля опухоль-ассоциированных нуклеиновых кислот, принимающих участие в опухолевой прогрессии и диссеминации, может подавлять рост опухоли и оказывать лечебный эффект. Несмотря на активные исследования противоопухолевого потенциала различных экзогенных рибонуклеаз, ряд из них, в частности, бычья панкреатическая РНКаза А, бычья панкреатическая ДНКаза I и микробная рибонуклеаза *Bacillus intermedius* (биназа), с точки зрения противоопухолевой активности охарактеризованы недостаточно и фрагментарно. Кроме того, имеющиеся данные не позволяют судить о механизмах противоопухолевых эффектов. С другой стороны, опухоль-ассоциированные нуклеиновые кислоты при задействовании антиген-презентирующих клеток, в частности дендритных клеток, могут участвовать в запуске противоопухолевого иммунитета. Соответственно, ДНК и РНК, кодирующие опухолеспецифические антигены, используют для нагрузки дендритных клеток и

индукции специфического противоопухолевого ответа *in vivo*. В этом аспекте поиск иммуногенных опухоль-ассоциированных антигенов и систем их доставки в ДК является крайне актуальным для создания ДК-вакцин с высокой противоопухолевой активностью.

Общая характеристика работы. Новизна исследований, полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Диссертационная работа Мироновой Н.Л. представляет собой завершённое исследование, проведенное на большом спектре опухолевых моделей мыши различного гистогенеза, которое позволило выяснить механизмы подавления опухолевой прогрессии под действием природных нуклеаз и дендритных клеток, а также выявить ряд значимых миРНК, мРНК, tandemных повторов и онкогенов, ортологи которых у человека могут быть использованы в качестве молекулярных биомаркеров для диагностики опухолевых заболеваний, ответа на лечение и мишеней для ген-направленной терапии.

Диссертационная работа Мироновой Н.Л. имеет классическую структуру и состоит из введения, обзора литературы (Глава 1), материалов и методов исследования (Глава 2), результатов собственных исследований и их обсуждения (Главы 3-7), выводов, приложений и списка цитируемой литературы (681 ссылка). Текст изложен на 317 страницах, иллюстрирован 60 рисунками, включает 27 таблиц.

В литературном обзоре, озаглавленном «Природные нуклеазы, проявляющие противоопухолевую активность, и механизмы их действия», автором проанализирован обширный материал, касающийся опухоль-ассоциированных внеклеточных нуклеиновых кислот (внДНК и внРНК), их участия в злокачественной трансформации клеток и механизмов, лежащих в основе этих процессов. Отдельный раздел посвящен роли эндогенных нуклеаз млекопитающих в контроле внутриклеточных событий и сигнальных путей, ответственных за онкотрансформацию. Заключительный раздел литературного обзора посвящен природным нуклеазам с противоопухолевой активностью, механизмам их противоопухолевого действия и возможности применения экзогенных нуклеаз для контроля онкотрансформации и опухолевого роста. Литературный обзор выстроен логично, написан основательно и снабжен достаточным для комфортного восприятия количеством рисунков и таблиц. В целом литературный обзор свидетельствует о хорошем владении автором современной литературой и уверенной ориентации в выбранной области исследований, и позволяет лучше понять собственные результаты автора.

Глава 2 «Экспериментальная часть» содержит детальное и четкое описание методов, использованных автором для решения поставленных задач. Обращает на себя внимание разнообразие и современный уровень подходов, использованных в работе.

В Главах 3 – 7, объединенных общим заголовком «Подавление опухолевой прогрессии путем инактивации опухоль-ассоциированных нуклеиновых кислот и индукции специфического иммунного ответа», приведены результаты исследований, полученные автором. Глава 3 посвящена выбору катионных липосом, в том числе адресных, для трансфекции опухолевых нуклеиновых кислот в дендритные клетки и разработке противоопухолевых вакцин на их основе. Автором впервые получены прототипы высокоэффективных дендритно-клеточных вакцин, нагруженные комплексами опухолеспецифической РНК в составе мультикомпонентных адресных липосом, состоящих из липида на основе двух остатков холестерина, липида-хелпера и

липоконъюгата, содержащего остаток маннозы, присоединенный к диалкилглицерину с помощью скваратного линкера. Показана способность ДК-вакцин эффективно подавлять рост экспериментальных опухолей различного гистогенеза и метастазирование. Продемонстрировано, что профилактическая схема лечения ДК-вакцинами наиболее эффективна в отношении высокоагрессивных метастазирующих опухолей, тогда как терапевтическая схема - в лечении неметастазирующих опухолей. Показано, что липоплексы опухолевой РНК и адресных липосом могут быть применены для индукции противоопухолевого ответа, как бесклеточные вакцины, минуя стадию приготовления ДК-вакцин.

Глава 4 посвящена исследованию противоопухолевого и антиметастатического потенциала бычьей панкреатической РНКазы А, бычьей панкреатической ДНКазы I и микробной рибонуклеазы *Bacillus intermedius* (биназы). Автором впервые продемонстрирован противоопухолевый и антиметастатический потенциал РНКазы А и биназы и антиметастатический потенциал ДНКазы I на широком спектре опухолевых моделей, что обосновывает перспективность дальнейших исследований этих ферментов в качестве противоопухолевых препаратов.

В Главе 5 проведено исследование иммуномодулирующего действия ДК-вакцин, РНКазы А, ДНКазы I и биназы, ассоциированное с противоопухолевым ответом. Автором показано, что ДК-вакцины *in vivo* индуцируют поляризацию Т-хелперных ответов как 1 так и 2 типов при сдвиге равновесия $Th1 > Th2$, не вызывают развития провоспалительного ответа и индукции регуляторных Т-клеток. РНКазы А и биназа вызывают положительную модуляцию противоопухолевого иммунного ответа.

Глава 6 посвящена исследованию механизма противоопухолевого и антиметастатического действия РНКазы А и поиску ее молекулярных мишеней среди регуляторных и кодирующих РНК. Впервые показано, что противоопухолевое и антиметастатическое действие РНКазы А реализуется посредством многоуровневой регуляции, как на уровне опухолевой клетки, так и на уровне организма. На уровне опухолевой клетки и в кровотоке животных-опухоленосителей РНКазы А вызывает перераспределение репертуара мРНК. В результате в опухоли происходит повышение функционирования энергетических каскадов, перераспределение в эффективности функционирования механизмов, связанных с регулированием клеточного роста и диссеминации, а также ингибция сигнальных путей, участвующих в злокачественной трансформации. Эти события приводят к подавлению опухолевой прогрессии, что на уровне организма проявляется в подавлении роста первичной опухоли и метастазов.

Глава 7 посвящена исследованию механизма антиметастатического действия ДНКазы I и поиску молекулярных мишеней среди внеклеточных опухолево-ассоциированных ДНК. Впервые показано, что антиметастатическое действие ДНКазы I реализуется за счет деградации специфических последовательностей опухолево-ассоциированных ДНК в крови животных-опухоленосителей: фрагментов онкогенов *Hmga2*, *Myc*, *Jun* и фрагментов tandemных повторов подсемейств L1 и подсемейств B1-B4, относящихся к ретротранспозонам, которые участвуют в процессе метастазирования.

Необходимо подчеркнуть, что эти результаты носят не просто исследовательский характер, а имеют практическое значение, являясь основой для разработки новых

протоколов терапии опухолевых заболеваний с использованием дендритно-клеточных вакцин и адъювантной противоопухолевой терапии с помощью нуклеаз.

Достоверность полученных результатов

В целом, диссертационная работа Мироновой Н.Л. оформлена аккуратно и содержит значительное количество экспериментальных данных, а также характеризуется логичным изложением результатов и хорошо оформленными иллюстрациями. Выводы диссертационной работы корректны и полностью подтверждены полученными экспериментальными результатами, достоверность которых не вызывает сомнений. Автореферат достаточно полно отражает содержание диссертации.

Основные результаты работы представлены и апробированы на 44 российских и международных научных конференциях, и опубликованы в рецензируемых научных журналах (22 статьи). По результатам исследований получен один патент. Автореферат включает основные положения, выносимые на защиту, и его содержание полностью соответствует диссертации. Содержание диссертационной работы соответствует специальности 03.01.04 – биохимия.

Значимость для науки и практики полученных автором диссертации результатов

Диссертационная работа Мироновой Н.Л. является первым систематическим исследованием механизмов подавления прогрессии опухолей под действием дендритных клеток и природных нуклеаз. Полученные в работе результаты позволили выявить ряд значимых миРНК, мРНК, tandemных повторов и онкогенов мыши, ортологи которых у человека могут быть использованы в качестве молекулярных маркеров для диагностики опухолевых заболеваний, ответа на лечение и мишеней для ген-направленной терапии.

Автором получены ДК-вакцины, способные индуцировать эффективный противоопухолевый иммунный ответ на экспериментальных опухолях мыши, которые могут быть предложены в качестве прототипов ДК-вакцин для лечения онкологических заболеваний человека. Выявлен высокий противоопухолевый и антиметастатический потенциал бычьей панкреатической РНКазы А, микробной рибонуклеазы *Bacillus intermedius* (биназы) и бычьей панкреатической ДНКазы I на экспериментальных опухолях мыши, что позволяет рассматривать эти нуклеазы как перспективные агенты адъювантной противоопухолевой терапии человека.

Результаты работы могут представлять интерес для Института молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН, Института биоорганической химии имени М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Научно-исследовательского института биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Новосибирского государственного университета, Научно-исследовательского института фундаментальной и клинической иммунологии, Института цитологии и генетики СО РАН, Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН и других организаций, занимающихся исследованиями в области молекулярной биологии и экспериментальной онкологии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По объему, уровню выполнения, качеству проведенных исследований, актуальности, высокой научной и практической новизны полученных результатов диссертационная работа Мироновой Н.Л. является завершенным научно-квалификационным исследованием, совокупность теоретических положений которого можно квалифицировать как новое крупное достижение в решении важной проблемы подавления прогрессии опухолей путем инактивации опухолеспецифических нуклеиновых кислот и запуска противоопухолевого иммунного ответа. Таким образом, диссертация полностью соответствует требованиям ВАК РФ к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук в п. 9 «Положения о присуждении учёных степеней» Постановления Правительства РФ «О порядке присуждения ученых степеней» от 24.09.2013 №842 с изменениями от 21.04.2016 №335. Автор диссертации, Миронова Надежда Львовна, безусловно заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.04. – биохимия.

Отзыв на диссертационную работу Мироновой Надежда Львовны подготовлен доктором медицинских наук, профессором Черных Еленой Рэмовной, обсужден и утвержден на заседании Ученого совета Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» (протокол №4 от 03 апреля 2018 г).

Заместитель директора по научной работе
ФГБНУ НИИ Фундаментальной и клинической иммунологии
Заведующая лабораторией клеточной иммунотерапии
чл.-корр. РАН, д.м.н., профессор

Черных Е.Р.

Подпись Е.Р. Черных удостоверяю
Ученый секретарь, к.б.н.

Гаврилова Е.Д.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» (НИИФКИ), Адрес учреждения: 630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, д.14, тел 8-(383) 2222674, e-mail: niiki01@mail.ru