

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию

Мироновой Надежды Львовны

«Механизмы подавления прогрессии экспериментальных опухолей под действием дендритных клеток и природных нуклеаз», представленной на соискание ученой степени доктора

биологических наук

по специальности 03.01.04 – биохимия

Актуальность темы диссертационной работы

По данным международного агентства по изучению рака злокачественными опухолями в 2000 году в мире заболели 10 млн. человек, из них умерло около 8 млн. человек. В 2015 году число заболевших достигло 20 млн. человек, умерших на сегодня около 13 млн. Последние цифры означают, что ранняя диагностика и эффективные препараты позволили продлить жизнь раковым больным, но в то же время нарастает тенденция к увеличению больных онкологическими заболеваниями. За последние 10 лет прирост по онкологическим заболеваниям по данным Всемирной организации здравоохранения составил около 15%. Говоря о статистике в онкологии, нельзя обойти показатель смертности — онкологические заболевания уносят каждый год не менее 300 тыс. жизней только в России (и с каждым годом эта цифра только растет), и в течение следующих 5–7 лет, по прогнозам ВОЗ, смертность из-за онкологических заболеваний выйдет на первое место в мире по причине смертей (в настоящее время на первом месте стоят сердечно-сосудистые заболевания).

Диссертационная работа Мироновой Надежды Львовны посвящена, в одной части, исследованию возможности воздействия природных нуклеаз на опухоль-ассоциированные РНК и ДНК, различные группы которых играют существенную роль развитию опухолей, и, в частности, в метастазировании. Ферменты, способные разрушать нуклеиновые кислоты уже в течение десятков лет рассматриваются как возможные противоопухолевые и антиметастатические агенты. Различия в спектре и количестве нуклеиновых кислот, продуцируемых опухолевыми клетками, служат одним из факторов, обуславливающим возможность селективного воздействия на них с целью разработки потенциальных противоопухолевых препаратов избирательного действия. Действительно, на сегодняшний день таргетное поражение опухолевых клеток разнообразными терапевтическими агентами является важнейшей, во многом не решенной проблемой, поскольку развитие устойчивости к современным ингибиторам роста раковых клеток и массивные побочные эффекты химиотерапевтиков приводят к тяжелым последствиям для пациента.

Другая часть диссертации Н.Л. Мироновой связана с разработкой перспективных комплексов противоопухолевой терапии на базе антиген-презентирующих дендритных клеток. Белки и кодирующие их РНК, отсутствующие или экспрессирующиеся на низком уровне в нормальных клетках, могут выступать в роли опухолеспецифических антигенов для антиген-презентирующих клеток, в частности, дендритных. Надежда Львовна в своей работе применила актуальный подход к ингибированию роста опухолей с применением дендритных клеток, нагруженных опухолеспецифическими антигенами в виде опухолеспецифической РНК,

доставленной в дендритные клетки с помощью липосомальных композиций, а также провела серьезное экспериментальное исследование противоопухолевого и антиметастатического потенциала природных нуклеаз: бычьей панкреатической РНКазы А, бычьей панкреатической ДНКазы I и микробной рибонуклеазы *Bacillus intermedius* (биназы) на экспериментальных опухолевых моделях мыши. Разработка прототипов дендритно-клеточных вакцин и новых препаратов избирательного действия на основе природных ферментов нуклеаз для лечения онкологических заболеваний имеет бесспорную значимость и актуальна для борьбы с одной из самых тяжелых патологий.

Содержание диссертации, ее завершенность

Диссертация Н.Л. Мироновой построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов собственных исследований и их обсуждения, выводов, приложений и списка цитируемой литературы (681 ссылка). Работа Н.Л. Мироновой представляет собой завершенное фундаментальное исследование, проведенное на широком спектре моделей опухолей различного гистогенеза мыши. В результате выяснены механизмы подавления опухолевой прогрессии под действием природных нуклеаз и дендритных клеток.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций

В работе Н.Л. Мироновой на широком спектре опухолевых моделей продемонстрирован противоопухолевый и антиметастатический потенциал панкреатической РНКазы А человека и микробной рибонуклеазы *Bacillus intermedius* (биназы) и антиметастатический потенциал бычьей панкреатической ДНКазы I. Выявлено, что каталитическая активность ферментов является важным условием для проявления ими противоопухолевого и антиметастатического эффекта. При этом четко показано, что молекулярными мишенями РНКазы А являются миРНК в кровотоке и клетках опухоли. Под действием РНКазы А в крови происходит снижение уровня миРНК, а в опухолевых клетках – индукция их синтеза наряду с повышением уровня экспрессии генов, участвующих в биогенезе миРНК, и снижением уровня экспрессии ингибиторов биогенеза 244миРНК. Интересным результатом, заслуживающим особого внимания, является повышение уровня миРНК семейства let-7, негативно регулирующих развитие опухоли.

Не только обоснованные положения о противоопухолевом действии экзогенных нуклеаз, но и разработанные прототипы высокоэффективных дендритно-клеточных вакцин против опухолей различного гистогенеза мыши также имеют под собой статистически достоверные данные экспериментов, подтверждающие избирательную и эффективную доставку опухолеспецифической РНК в составе мультикомпонентных адресных липосом.

Важнейшие научные положения и выводы диссертации качественно подтверждены с использованием новейших методов, адекватных экспериментальных моделей и отличной статистики.

Достоверность и новизна полученных результатов и выводов и рекомендаций

В диссертационной работе Н.Л. Мироновой проведен полный и корректный анализ экспериментальных данных, которые являются абсолютно новыми, полученными на новых моделях с использованием современных методов. Биологические повторности опытов *in vitro* и *in vivo* дают обоснованную базу для корректной статистической обработки. В работе использованы стандартные подходы к обработке данных (t-тест критерия Стьюдента и однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с апостериорным критерием Фишера (Fisher LSD) и критерия Тьюки (Tukey); статистический анализ с использованием программы STATISTICA 10.0), а также биоинформатический анализ, базирующийся на оригинальных данных.

Значимость для науки и практики полученных автором результатов.

Н.Л. Миронова на серии опухолевых моделей подтвердила противоопухолевый и антиметастатический потенциал природных нуклеаз: РНКазы А, ДНКазы I и биназы. К фундаментально значимым выводам можно отнести установление того факта, 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, что приводит к изменению регуляторных каскадов клетки и негативной регуляции роста первичной опухоли и метастаз. Также убедительно показано, что антиметастатическое действие ДНКазы I ассоциировано с деградацией специфических вДНК в кровотоке животных-опухоленосителей, и основными ее мишенями являются фрагменты опухоль-ассоциированных генов *Hmga2*, *Mus* и *Jun* и tandemных повторов подсемейств *B1* и *L1*, уровень которых повышен в кровотоке животных-опухоленосителей. Обратим внимание, что эти tandemные повторы имеют высокую степень гомологии с *ALU* повторами человека, которые являются маркерами канцерогенеза. Н.Л. Миронова предполагает, что циркулирующие вДНК играют значительную роль в диссеминации опухоли. Это, в свою очередь, имеет огромный практический смысл: изменение уровня множества молекулярных мишеней в кровотоке под действием ДНКазы I по всей вероятности будет снижать инвазивный потенциал опухолей.

Конкретные рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

В практическом плане особенно ценны обнаруженные факты заметного ингибирования различных метастаз под действием исследуемых ферментов; при этом отчасти сохраняющаяся антиметастатическая активность инактивированных ферментов имеет определенное значение в плане перспектив их использования, свидетельствуя о возможности пролонгированного действия исследованных ферментов в организме, где они по крайней мере частично будут подвержены действию внутриклеточных ингибиторов. Выявлен ряд значимых мРНК, 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 таргетной терапии.

Несомненной практической ценностью обладают результаты, связанные с разработкой комплексов липосом с опухолевой РНК, а также прототипов дендритно-клеточных вакцин, несущих опухолевые антигены и способные индуцировать поляризацию Т-хелперных ответов, не вызывая развития провоспалительного ответа и индукции регуляторных Т-клеток.

Запатентованный автором способ лечения злокачественных опухолей у животных также имеет перспективы практического использования.

В целом, можно рекомендовать как непосредственно экзогенные нуклеазы, так и липосомные комплексы и модифицированные дендритные клетки для дальнейшей проработки деталей механизмов их действия и протоколов испытаний для внедрения в практическую медицину.

Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации

К несомненным достоинствам диссертационной работы Н.Л. Мироновой прежде всего относится высокий уровень экспериментальных исследований, проведенных продуманно, планомерно и качественно.

Использование широкого спектра моделей опухолей (аденокарцинома Кребс-2, карцинома легких Льюис (LLC) с первичным опухолевым узлом, метастатическая карцинома легких Льюис (LLC), гепатома HA-1, лимфосаркомы LS, RLS и RLS40, метастатическая меланома B16), часть из которых получена автором лично, внушает уверенность в достоверности сделанных выводов о противоопухолевом действии нуклеаз.

Часть работы, посвященная получению дендритных клеток, нагруженных опухолевым материалом с флуоресцентной меткой pEGFP для анализа качества трансфекции – суммарной РНК из ВНК-IR780 клеток, клеток меланомы мыши B16, клеток аденокарциномы Кребс-2 и клеток карциномы легких Льюис – с помощью поликатионных липосом, особенно трудоемкая, поскольку включает анализ противоопухолевой активности дендритных клеток и липоплексов с разными вариантами загрузки, оценку стимулирующего влияния комплексов на уровень пролиферации спленоцитов, праймирование Т-лимфоцитов *in vivo* с помощью липосом и серьезную статистическую обработку данных, полученных по профилактической и терапевтической схемам применения потенциальных вакцин.

Несомненным достоинством работы является также использование современных методов молекулярной биологии - ОТ-ПЦР для определения уровней мРНК генов *mdr1b*, *mdr1a*, *bcl-2*, *p53* в клетках первичных культур опухолей LS, RLS и RLS40; метод количественной ПЦР для оценки уровня экспрессии генов *RORg*, *Foxp3*, *GATA3* и *Tbet* в спленоцитах, а также генов ответственных за процессинг мРНК (*Drosha*, *Xpo5*, *Dicer1* и *Eif2c2*), валидация данных полного транскриптома. При подготовке библиотек к секвенированию, секвенирование, картирование и аннотирование последовательностей, обработка данных проводилась специалистами в области биоинформатики, что корректно указано автором в тексте методического раздела.

Диссертация прекрасно оформлена, снабжена рядом приложений, позволяющим оценить детали проведенных исследований.

К работе имеется ряд замечаний, которые ни в коей мере не умаляют достоинства проделанной Н.Л. Мироновой работы и должны быть приняты диссертантом к сведению во избежание неточностей и мелких ошибок в последующей научной деятельности.

(i) Штамм *Bacillus intermedius* не существует в современной классификации бактерий, его таксономическая принадлежность переопределена современными молекулярно-генетическими методами уже более 7 лет назад, теперь он имеет видовое название *B. pumilus* (GenBank Accession No. HQ650161.1).

(ii) Рассмотрение нуклеаз как перспективных агентов именно адъювантной терапии автором (цит. «позволяет рассматривать эти нуклеазы как перспективные агенты адъювантной противоопухолевой терапии человека») могло бы обсуждаться в дискуссии, но не в разделе «Практическая значимость», поскольку адъювантная терапия – это длительное подавление микрометастазов рака после удаления или лучевого излечения первичной опухоли, а в диссертационной работе хирургические мероприятия, химиотерапевтики и лучевая терапия для обработки модельных животных не применялись.

(iii) Аналогичное замечание касается неправильного использования термина «комбинированная терапия» Комбинированная терапия – это использование двух принципиально разных методов лечения (например, оперативного и лучевого; оперативного и химиотерапии; лучевой терапии и химиотерапии); Н.Л. Миронова в своей работе проводила эксперименты по сочетанной терапии (РНКаза А и циклофосфамид).

(iv) Хотелось бы посоветовать автору более внимательно относиться к стилистике текста. Так, словосочетание «идеологическое планирование» вызывает некоторое недоумение; вместо сложившегося вульгаризма «литературный обзор» лучше использовать корректное «обзор литературы»; а формулировка цели работы как «исследование...» не может отражать суть работы, поскольку само по себе исследование целью не является.

(v) Положение автора диссертационной работы (цит. «впервые продемонстрирован противоопухолевый и антиметастатический потенциал бычьей панкреатической РНКазы А и микробной рибонуклеазы *Bacillus intermedius* (биназы)») не совсем корректно: противоопухолевое действие этих ферментов установлено еще в конце XX века работами зарубежных и отечественных ученых [Tarnowski GS, Kassel RL, Mountain IM, Blackburn P, Wilson G, Wang D. Comparison of antitumor activities of pancreatic ribonuclease and its cross-linked dimer. *Cancer Res.* 1976 Nov;36(11 Pt 1):4074-8; Kurinenko VM, Kupriianov-Ashin, Kalacheva NV. Clinical regularities of the interaction of pancreatic and microbial RNase with cells *in vitro*. *Antibiot Khimioter.* 1993 Jan;38(1):28-33]. Более того, Н.М. Миронова сама пишет в обзоре литературы, что в 1972 г. Корейские ученые провели первое клиническое испытание РНКазы А как противоопухолевого препарата; если фермент вводили непосредственно в опухоль в высокой дозе (3мг/кг веса тела/день), наблюдалась регрессия опухоли вплоть до полного исчезновения. Понятно, что автор использовал широкий спектр новых опухолевых моделей; именно с акцентом на это формулировка о новизне была бы безупречной.

(vi) К сожалению, Н.Л. Миронова не обратила внимания на публикации, вышедшим в свет в конце XX века и касающимся исследований противоопухолевого потенциала биназы *in vivo*. В

Казанском университете, являвшимся головной организацией Федеральной Программы «Нуклеазы», была не только открыта биназа, но и изучен ее противоопухолевый потенциал [Kurinenko BM, Sobchuk LI, Sergeeva EV. The mechanism of the antitumor action of *Bacillus intermedius* ribonuclease. Antibiot Khimioter. 1995 May;40(5):12-5; Nekhoroshkova ZM, Kurinenko BM, Khusnullina KT, Karpova SI, Bulgakova RSh. The cytomorphological evaluation of the effect of *Bacillus intermedius* RNase on the organs of experimental animals. Nauchnye Doki Vyss Shkoly Biol Nauki. 1992;(4):74-9. и др.].

Что касается работ группы А.А. Макарова о цитотоксичности биназы по отношению к онкотрансформированным клеткам, то первая работа (совместная с Казанским университетом) появилась в 2007г. [Ilinskaya ON, Zelenikhin PV, Petrushanko IY, Mitkevich VA, Prassolov VS, Makarov AA. Binase induces apoptosis of transformed myeloid cells and does not induce T-cell immune response. Biochem Biophys Res Commun. 2007 Oct 5;361(4):1000-5].

К диссертанту имеется несколько вопросов:

1. Насколько в реальных условиях действия в организме может сохраняться каталитическая активность экзогенных РНКаз, и есть ли данные об устойчивости исследованных вами белков к протеолизу?
2. Не может ли инактивация РНКаз диэтилпирикарбонатом носить временный характер, и что было сделано для дезактивации следов DEPC?
3. Какой именно из массива полученных результатов, на ваш взгляд, имеет наибольшую эффективность для борьбы с онкологическими заболеваниями и наиболее близок к применению в практической медицине?

Учитывая весомый вклад в фундаментальную науку, а также высокий методический уровень исследования Н.Л. Мироновой, считаю, что диссертантом выполнена серьезная, сильная и современная работа.

Заключение о соответствии диссертации критериям, установленным Положением о порядке присуждения ученых степеней.

В заключение необходимо подчеркнуть, что большой объем проделанной экспериментальной работы, четкое планирование экспериментов и обоснованные выводы работы не вызывают никаких сомнений в ее соответствии критериям, установленным Положением о порядке присуждения ученых степеней.

Таким образом, диссертация Мироновой Надежды Львовны на соискание ученой степени доктора биологических наук является научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований разработаны и экспериментально подтвержденные положения, совокупность которых можно квалифицировать как научное достижение в решении проблемы разработки новых средств противоопухолевой терапии на основе природных ферментов нуклеаз и некодирующих фрагментов нуклеиновых кислот, внедренных в дендритные клетки. Несомненно, решение такой научной проблемы имеет важное социально-экономическое и хозяйственное значение, поскольку вносит существенный вклад в развитие новых подходов к разработке средств противоопухолевой терапии.

Диссертация Н.Л. Мироновой полностью соответствует требованиям п. 9-14 раздела II Постановления Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 «О порядке присуждения ученых степеней» (с изменениями от 21 апреля 2016 г. № 335 «О внесении изменений в Положение о присуждении ученых степеней») а ее автор заслуживает присуждения искомой ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

Официальный оппонент,
заведующий кафедрой микробиологии
Института фундаментальной медицины и биологии
Казанского (Приволжского) федерального университета
доктор биологических наук, профессор,
действительный член Академии наук республики Татарстан
Ильинская Ольга Николаевна

Адрес: 420008 Казань, ул. Кремлевская, 18
E-mail: ilinskaya_kfu@mail.ru
Телефон: +7 8432337855

Дата

Гербовая печать

