

## **ОТЗЫВ**

официального оппонента на диссертацию **Мироновой Надежды Львовны** на тему **«Механизмы подавления прогрессии экспериментальных опухолей под действием природных нуклеаз и дендритных клеток»**, представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.04 — биохимия.

### **Актуальность темы выполненной работы**

В диссертационной работе Мироновой Н.Л. излагаются результаты серии исследований по терапии экспериментальных опухолей у мышей при помощи дендритных клеток (ДК) и природных нуклеаз. ДК в настоящее время рассматривают в качестве наиболее перспективного и универсального клеточного носителя для специфической противоопухолевой терапии, однако для большинства типов опухолей проблемой является доставка в ДК опухолеспецифических антигенов в форме, пригодной для представления Т-лимфоцитам. В данной работе в качестве подхода к данной проблеме исследуется доставка опухолеспецифической РНК с помощью липосомальных композиций. Нуклеазы являются другим перспективным классом противоопухолевых агентов, однако механизмы их действия стали изучать относительно недавно, по мере того как стала выясняться существенная и разнообразная роль эндогенных нуклеиновых кислот в опухолевой прогрессии. Поэтому значительная часть диссертации посвящена сбору новых данных, позволяющих пролить свет на возможные молекулярные и клеточные механизмы, объясняющие противоопухолевое и антиметастатическое действие как экзогенных нуклеаз, так и ДК-вакцин. Изучали влияние нуклеаз на представленность специфических последовательностей среди внутриклеточных и циркулирующих нуклеиновых кислот, а также иммуномодулирующее действие нуклеаз и ДК-вакцин. Все полученные данные являются новыми и актуальными для поиска новых биохимических подходов к противораковой терапии.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация Мироновой Н.Л. построена по традиционной схеме и состоит из введения, 7 глав, содержащих обзор литературы, материалы и методы исследования и описание результатов исследования с их обсуждением, выводов, списка литературы и 2 приложений. Работа изложена на 317 страницах, содержит 60 рисунков и 27 таблиц в основном тексте, еще 6 таблиц содержится в Приложении 1. Список цитируемой литературы включает 681 источник. Приложение 2 содержит список из 22 статей и 1 патента по теме диссертации, а также список 54 тезисов конференций.

Во «Введении» автор формулирует цели и задачи своей работы, обосновывает актуальность исследования, оценивает научную новизну и потенциальную практическую значимость результатов, формулирует положения, выносимые на защиту. Поскольку проект выполнен в сотрудничестве с исследователями из нескольких институтов Новосибирска и Москвы, важной частью введения является четко и детально написанный раздел о личном вкладе автора в полученные результаты.

Глава 1, содержащая обзор литературы, состоит из собственного введения, 3 разделов и заключения, и посвящена противоопухолевой активности природных нуклеаз. Обзор отражает современные представления о предмете исследования и свидетельствует о высокой квалификации диссертанта в области биохимии и смежных дисциплин. Современное состояние знаний о лечении рака при помощи ДК-вакцинации отчасти отражено в подробном описании актуальности темы, а отчасти - в мини-обзоре, с которого начинается глава 3.

Глава 2, содержащая описание материалов и методов, занимает более 40 страниц и подробно описывает научно-методологические подходы, примененные автором для решения поставленных задач. Материалы и методы, использованные соавторами, описаны подчеркнуто лаконично - так, например, раздел "липосомы" представляет собой фактически расшифровку использованных обозначений, и не предназначен в качестве руководства по получению определенных формуляций липосом.

Главы 3-7 посвящены изложению и обсуждению результатов лечения экспериментальных опухолей у мышей с помощью ДК-вакцин и природных нуклеаз, и исследованию механизмов их действия с точки зрения воздействия на противоопухолевый иммунный ответ и, в случае нуклеаз, прямого влияния на представленность специфических последовательностей в мРНК, некодирующих РНК и внеклеточной ДНК. Это очень объемная часть работы, занимающая 120 страниц. Каждая из глав снабжена собственными мини-введением и заключением. Результаты представлены в большом количестве таблиц и проиллюстрированы многочисленными рисунками, которые облегчают восприятие материала.

В целом диссертационная работа производит хорошее впечатление. Исследование выполнено на высоком методическом уровне, сформулированные в работе выводы базируются на обширном экспериментальном материале.

#### **Научная новизна и научно-практическая значимость полученных результатов.**

Основная ценность диссертационной работы Мироновой Н.Л. заключается в широком спектре использованных мышинных моделей злокачественных опухолей. Такой систематический подход позволил получить объемную картину противоопухолевых свойств ДК-вакцин и природных нуклеаз. При изучении ДК-вакцин была впервые подобрана формуляция адресных липосом, обеспечивающих эффективную доставку опухолеспецифической РНК в ДК как *in vitro*, так и *in vivo*. При изучении противоопухолевых свойств природных нуклеаз впервые были выявлены свойства раковых клеток, которые изменяются при экспериментальной терапии, а также метаболические каскады и сигнальные пути, изменения в которых коррелируют с изменениями в наблюдаемых уровнях определенных микро-РНК. Также сделаны интригующие наблюдения относительно изменения концентраций определенных последовательностей ДНК в крови животных при лечении экспериментальных опухолей ДНКазой I.

Все представленные результаты являются новыми и имеют большой потенциал как для разработки подходов к терапии рака, так и для исследования биохимических и клеточных механизмов опухолевого роста и метастазирования.

Сделанные в работе выводы имеют как теоретическую, так и практическую значимость.

### **Достоверность и обоснованность результатов исследования**

Достоверность полученных результатов обеспечена использованием комплекса современных методов исследований, тщательным анализом полученных данных и корректными способами статистической обработки. Выводы диссертационной работы основаны на полученных результатах, содержание автореферата полностью отражает основные результаты и выводы диссертации.

Результаты диссертационной работы были представлены автором и соавторами на многочисленных международных и российских научных конференциях. По теме диссертации опубликовано 22 статьи в научных изданиях, рекомендованных Министерством образования и науки Российской Федерации для опубликования результатов диссертационных работ, имеется 1 патент. Половина статей опубликована в зарубежных журналах и очень достойно цитируются.

Недостатки, которые можно обнаружить при детальном ознакомлении с диссертацией, являются естественным продолжением ее достоинств:

1. Ввиду большого количества разнообразных экспериментов диссертация имеет очень большой объем. При написании обзора литературы было принято правильное решение сконцентрироваться на природных нуклеазах. Работа выиграла бы еще больше от более лаконичного изложения результатов (которые во многом пересказывают содержание двух кандидатских диссертаций, выполненных в рамках данного проекта) и от сокращения списка литературы.

2. По той же самой причине по большинству исследованных направлений не было возможности провести все мыслимые эксперименты. Такое положение дел открывает отличные перспективы для дальнейшего развития отдельных направлений исследований, но одновременно провоцирует автора на чрезмерное обобщение полученных результатов, например:

2.1. Следует с осторожностью говорить о том, что человеческие ортологи найденных последовательностей РНК и ДНК мыши могут быть использованы в качестве молекулярных маркеров или мишеней чего бы то ни было: несмотря на эволюционную близость мыши и человека, между экспериментальными опухолями у мышей и новообразованиями у человека имеется большое количество очень существенных отличий. Более корректно было бы сказать, что соответствующие ортологи у человека имеет смысл исследовать на пригодность в качестве диагностических биомаркеров и терапевтических мишеней.

2.2. Вывод 2 в его нынешней формулировке легко понять так, будто противоопухолевый и антиметастатический потенциал природных нуклеаз продемонстрирован впервые. Это, разумеется, не так, что следует, в том числе, и из информации, приведенной самим автором в обзоре литературы. Новизна и ценность данной работы заключается в более тонких нюансах, таких как спектр использованных мышинных моделей или пониженная концентрация нуклеаз. Было бы хорошо, не теряя лаконичности формулировок, указать на эти моменты более отчетливо.

2.3. Результаты, полученные при изучении иммуномодулирующего действия ДК-вакцин и природных нуклеаз, очень интересны, в том смысле, что такое

кое действие определенно имеет место. Однако эти результаты пока имеют достаточно предварительный характер. В частности, измерение Th1 и Th2 цитокинов в сыворотке дает слишком "размазанные" результаты, которые меняются в зависимости от используемого агента не слишком понятным образом. Потребуются измерения продукции цитокинов на уровне отдельных клеток (при помощи проточной цитометрии или методики ELISPOT) и какие-то функциональные исследования, чтобы можно было делать проверяемые предсказания об индукции воспаления и поляризации Th ответа.

2.4. В случае регуляторных Т-лимфоцитов, вряд ли корректно говорить об индукции этой популяции лишь на основании снижения экспрессии FoxP3, без дополнительных экспериментов, в которых эта популяция была бы охарактеризована если не по функциональной активности, то хотя бы по дополнительным поверхностным маркерам.

Сделанные замечания имеют дискуссионный характер, не умаляют научной ценности полученных данных и сделанных выводов, и не снижают общего очень хорошего впечатления от диссертационной работы.

### **Заключение**

На основе всего вышеизложенного можно сделать вывод, что диссертационная работа Мироновой Н.Л. является цельным законченным научным исследованием и соответствует критериям, установленным «Положением о присуждении ученых степеней» (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; 29.05.2017 г. № 650), а сама Надежда Львовна, несомненно, заслуживает присвоения искомой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.04 — биохимия.

Официальный оппонент

**Купраш Дмитрий Владимирович,**

главный научный сотрудник лаборатории

передачи внутриклеточных сигналов в норме и патологии

Федерального государственного бюджетного учреждения науки

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта

Российской академии наук (ФГБУН ИМБ РАН),

доктор биологических наук, профессор, профессор РАН, член-корр. РАН



119991, Москва, ул. Вавилова, 32

8(499) 135-9770, kuprash@eimb.ru

Подпись д.б.н., член-корр. РАН Купраша Д.В.

«Удостоверяю»

Ученый секретарь ФГБУН ИМБ РАН

к.в.н. **Бочаров А.А.**

