

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию

Мироновой Надежды Львовны

«Механизмы подавления прогрессии экспериментальных

опухолей под действием дендритных клеток и природных нуклеаз»,

представленную к защите на соискание ученой степени доктора биологических

наук по специальности 03.01.04 – биохимия

Актуальность темы исследования обусловлена крайне неблагоприятной ситуацией быстрого роста онкозаболеваний, а именно, за ближайшие 20 лет в мире число новых случаев заболевания раком возрастет примерно на 70% (ежегодно число онкобольных будет увеличиваться на 22 млн. человек). В нашей стране ежегодно регистрируется более 500 тыс. новых случаев злокачественных новообразований и у большинства впервые обратившихся болезнь обнаруживается уже на III-IV стадии. Высокая заболеваемость и смертность от онкологических заболеваний требуют применения высокодозной химиотерапии, которая до сих пор остается одним из основных, а иногда и единственным средством лечения. Однако, современная медицина обладает рядом успешных и эффективных методов лечения злокачественных новообразований. Одним из таких методов является подавление на разных этапах опухолевой прогрессии, в которой принимают участие опухоль-ассоциированные нуклеиновые кислоты (НК), играющие двойную роль, либо отрицательную и способствуют прогрессии опухоли, либо положительную - являясь важным звеном, формирующим противоопухолевый иммунитет. Данные об участии опухоль-ассоциированных НК в канцерогенезе и в метастазировании позволили особое внимание обратить на такие НК-расщепляющие ферменты, как экзогенные рибонуклеазы природного и микробного происхождения, для которых показан высокий противоопухолевый потенциал, но данные весьма противоречивы. Так, исследования противоопухолевого потенциала наиболее каталитически активного представителя семейства РНКазы А - бычьей панкреатической РНКазы А оказались противоречивыми, а информация о

противоопухолевой активности ДНКазы I и механизмах, опосредующих эту активность, остается фрагментарной и не до конца выясненной. Другим подходом лечения онкологических заболеваний пациентов является применение дендритных клеток (ДК), нагруженных опухолеспецифическими антигенами.

В этой связи, для диссертационной работы Мироновой Н.Л. объектами изучения механизма подавления прогрессии экспериментальных опухолей в качестве опухоль-ассоциированных нуклеиновых кислот были выбраны бычья панкреатическая РНКаза А, микробная рибонуклеаза *Bacillus intermedius* (биназы), бычья панкреатическая ДНКаза I и дендритные клетки.

Научная новизна, теоретическая и практическая значимость исследования.

Впервые были исследованы неадресные и адресные липосомы, обладающие трансфекционной активностью, сравнимой с лучшими системами доставки, и могут быть использованы для доставки опухолеспецифических РНК в ДК *in vivo* и индукции созревания высокоиммуногенных ДК. Показана возможность использования таких комплексов адресных липосом в качестве бесклеточных противоопухолевых вакцин, сравнимых по эффективности с ДК-вакцинами, нагруженными *ex vivo*. Автором впервые выявлен ряд значимых опухоль-ассоциированных 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.

Впервые получены прототипы высокоэффективных дендритно-клеточных вакцин (ДК-вакцин), нагруженные комплексами опухолеспецифической РНК в составе мультикомпонентных адресных липосом и показана способность ДК-вакцин эффективно подавлять рост экспериментальных опухолей различного гистогенеза и метастазирование. В том числе показано, что наиболее эффективна профилактическая схема лечения ДК-вакцинами в отношении высокоагрессивных метастазирующих опухолей, тогда как терапевтическая схема - 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.

Впервые обнаружен противоопухолевый и антиметастатический потенциал бычьей панкреатической РНКазы А и микробной рибонуклеазы *Bacillus intermedius* (биназы) и только антиметастатический потенциал бычьей панкреатической ДНКазы I. Установлен механизм реализации противоопухолевого и антиметастатического действия РНКазы А и антиметастатического действия ДНКазы I, что открывает перспективы для дальнейшего исследования этих ферментов в качестве противоопухолевых препаратов.

Общая характеристика диссертационной работы.

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов собственных исследований и их обсуждения, выводов, приложений и списка цитируемой литературы. Текст изложен на 317 страницах, иллюстрирован 60 рисунками, включает 27 таблиц, список литературы содержит 681 библиографический источник. Приложение 1 включает 6 таблиц, приложение 2 – список научных трудов, вошедших в диссертацию.

Во введении автор убедительно обосновал актуальность темы, постановку цели и задачи исследования.

Литературный обзор полностью раскрывает мировую значимость исследований, которым посвящена диссертационная работа Мироновой Надежды Львовны, а именно, очень обстоятельно дается материал об опухолю-ассоциированных внеклеточных нуклеиновых кислотах (РНК и ДНК) и их роли в канцерогенезе, о роли эндогенных РНКаз и ДНКаз млекопитающих в контроле внутриклеточных событий сигнальных путей, ответственных за онкотрансформацию, а также экзогенных противоопухолевых нуклеаз и механизме их действия.

Глава «Материалы и методы исследования» изложена на 30 страницах, где автор работы приводит подробное описание всем подготовительным процессам для проведения исследований, дает характеристику использованных реактивов,

биохимических реагентов, дизайн введения веществ экспериментальным животным, используемых штаммов опухолей, подробное описание современных методов, приборной базы, что позволяет уже оценить масштабность, объем и уровень проведенных исследований.

Собственные исследования и их обсуждения изложены в 5-ти главах. Хотелось остановить внимание на отдельных и важных результатах, а именно, противоопухолевые вакцины на основе модифицированных дендритных клеток, способных экспрессировать и презентировать опухолеспецифические антигены и запускать цитотоксический Т-клеточный ответ при профилактической схеме применения эффективны в отношении высокоагрессивных метастазирующих опухолей, а при терапевтической схеме - неметастазирующих опухолей. Это было показано на опухолевой модели мыши, имеющие преимущество в том, что они гомологичны опухолям человека, и, в дальнейшем схемы могут быть успешны в применении ДК-вакцин для апробирования в клинике. Так, аденокарцинома Кребс-2 (неметастазирующая опухоль с первичным узлом) соответствует аденокарциноме человека; меланома В16 (метастатическая модель без первичного узла) соответствует метастатической меланоме человека и имитирует клиническую ситуацию, когда в организме детектируются только метастазы; карцинома легких Льюис (метастазирующая опухоль с первичным узлом) соответствует анапластической карциноме легких человека. Впервые было показано, что профилактические ДК-вакцины наиболее эффективны именно в предотвращении/ингибировании развития метастазов.

При исследовании противоопухолевого и антиметастатического потенциала бычьей панкреатической РНКазы А, бычьей панкреатической ДНКазы I и микробной рибонуклеазы *Bacillus intermedius* (биназы) показано, что монотерапия РНКазой А или циклофосфамидом приводит к торможению роста первичной опухоли на 30% ($p < 0.01$) и 70% ($p < 0.0001$), соответственно, в том время как в составе комбинированной терапии эффект возрастает до 85% ($p < 0.0001$). Природные нуклеазы обладают высоким противоопухолевым и

антиметастатическим потенциалом и являются препаратами - кандидатами для пре-клинических и клинических исследований.

Исследования иммуномодулирующего действия ДК-вакцин, РНКазы А, ДНКазы I и биназы, показали, что применение РНКазы А и биназы для лечения животных с модельными опухолями сопровождалось положительной модуляцией противоопухолевого иммунного ответа, которая заключалась в снижении уровня провоспалительных цитокинов и повышении уровня интерферонов.

Впервые показано, что ДНКазы I вызывает неспецифическую антигенную стимуляцию при введении в организм животных-опухоленосителей. Автор предполагает, что иммуностимулирующее действие ДНКазы I может вносить вклад в наблюдаемый антиметастатический эффект за счет повышения функционирования компонентов иммунной системы, находящихся в состоянии супрессии при прогрессировании опухоли, в частности, антиген-представляющие клетки.

Установлено, что каталитическая активность ферментов является важным условием для проявления ими противоопухолевого и антиметастатического эффекта. Для исследованной ДК-вакцины наряду с наблюдаемым противоопухолевым и антиметастатическим действием обнаружено *in vivo* отсутствие активации провоспалительного ответа и поляризации как Th1, так и Th2 типов Т-хелперного ответа со сдвигом равновесия $Th1 > Th2$. Кроме того, введение ДК, нагруженных РНК-В16 в комплексах с липосомами серии N-DOPE, приводило к увеличению уровня ИЛ-1 α , поляризующего Т-клеточный компонент противоопухолевого ответа. Наблюдаемые иммунологические показатели свидетельствуют о специфическом противоопухолевом, иммуномодулирующем действии ДК и природных нуклеаз, что позволяет их использовать в качестве противоопухолевых препаратов.

Работа завершается обстоятельными выводами, отражающими полученные в ходе исследования результаты. Высокая степень достоверности полученных результатов подтверждается достаточным объемом экспериментального материала с использованием современных методов и методических подходов,

соответствующих поставленным задачам. Автореферат диссертации соответствует ее содержанию.

Результаты данного исследования широко апробированы на российских и международных конференциях, по теме диссертации опубликовано 22 статьи в рецензируемых журналах, цитируемых в базах Web of Science и SCOPUS, а также получен патент РФ на изобретение №2317825 «Способ лечения злокачественных опухолей у животных».

Принципиальных замечаний по работе нет.

В качестве дискуссии хотелось получить ответы на следующие вопросы:

1. Какие каталитические нуклеазы эффективнее применять - при монотерапии, какие - в комплексной терапии онкозаболеваний?
2. С какими противоопухолевыми препаратами можно сочетать нуклеазы в комплексной терапии ?

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертация **Мироновой Надежды Львовны** «Механизмы подавления прогрессии экспериментальных опухолей под действием дендритных клеток и природных нуклеаз», выполненная при научной консультации доктора биологических наук, профессора, **Зенковой Марины Аркадьевны** в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН является законченной научно - практической работой. На основании выполненных автором исследований разработаны теоретические положения, совокупность которых можно определить как новое крупное достижение в биохимии, молекулярной биологии, фундаментальной медицине, онкомедицине. В диссертации решается актуальная проблема – исследование противоопухолевого и иммуностимулирующего потенциала природных нуклеаз и дендритных клеток, оказывающих свое действие на разных уровнях опухолевой прогрессии и взаимодействия опухоли с иммунной системой на экспериментальных моделях опухолей мыши. Получены прототипы

высокоэффективных дендритно-клеточных вакцин, способных эффективно подавлять рост экспериментальных опухолей различного гистогенеза и метастазирование. По своей актуальности, новизне, теоретической и практической значимости, обоснованности научных положений и выводов, полноте публикации материалов в научных печатных изданиях, работа Мироновой Н. Л. полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842, предъявляемых к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а ее автор, Миронова Надежда Львовна, безусловно, заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия

Официальный оппонент

профессор, доктор биологических наук,
заведующая лабораторией
фармакологических исследований
Отдела медицинской химии
Федерального государственного бюджетного
учреждения науки Новосибирского института
органической химии им. Н.Н. Ворожцова
Сибирского отделения
Российской академии наук

Толстикова
Татьяна Генриховна

630090, г. Новосибирск, проспект Академика Лаврентьева, д. 9
тел.: 8(383)330-07-01, вн. тел. 2-49
e-mail: tg_tolstikova@mail.ru

Подпись профессора Т.Г. Толстиковой
Заверяю Ученый секретарь ИОХ СО РАН

к.х.н.

08.05.2018



Р.А. Бредихин