



Врио директора
Федерального государственного
бюджетного научного учреждения
«Федеральный исследовательский центр
фундаментальной и трансляционной медицины»

М.И. Воевода
академик РАН, профессор

ОТЗЫВ

ведущей организации – Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» – на диссертационную работу Нуштаевой Анны Андреевны «Культуры онкотрансформированных клеток молочной железы и эндометрия для изучения опухолевой прогрессии и разработки терапевтических подходов», представленную на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология

Актуальность темы диссертационной работы

Современные достижения молекулярной биологии и генетики позволяют учитывать индивидуальные особенности организма пациента при терапии злокачественных новообразований. Одна из проблем эффективной терапии онкобольных состоит в многообразии генетических дефектов в клетках опухолей, что предопределяет необходимость дифференцированного подхода к лечению. Культивируемые клетки *in vitro* является традиционной моделью для исследований в области биологии рака и создания новых

методов профилактики, диагностики и лечения этого класса заболеваний. Первичные и иммортализованные культуры клеток опухолей человека и животных представляют собой удобный объект для изучения молекулярных и клеточных механизмов злокачественного роста и оценки эффектов лекарств. В то же время методы получения культур клеток из опухолей на сегодняшний день не стандартизованы, во многом остаются на уровне искусства экспериментатора. В 2012 году при активном участии компании Novartis была начата работа по созданию и характеристике энциклопедии культур клеток из опухолей человека (*Nature*, 2012, 483, 603–607), работа по характеристике этих культур продолжается по сегодняшний день (*Nature*, 2019, 569, 503–508). Стоит отметить, что оперативное получение персонифицированных для каждого пациента культур клеток остается до сих пор нерешенной задачей, а количество культур клеток человека даже для распространенных локализаций остается крайне ограниченным. Так, в упомянутой «энциклопедии клеточных культур» проводился анализ 58 культур клеток, полученных из опухолей молочной железы и менее 20 из клеток эндометрия. В самой крупной публичной коллекции клеточных линий ATCC хранится 45 клеточных линий из опухолей молочной железы и лишь три клеточных линии клеток эндометрия. Учитывая многообразие типов рака и индивидуальные особенности пациентов можно заключить, что количество клеточных линий, доступных исследователям явно не достаточно для проведения серьезных работ.

Исходя из этого диссертационная работа А.А. Нуштаевой, посвящённая получению культур клеток из опухолевой ткани молочной железы и эндометрия для изучения опухолевой прогрессии, представляется актуальной и своевременной.

Научная новизна работы и полученных результатов

Диссертационная работа А.А. Нуштаевой имеет явную прикладную направленность – по сути, это получение инструментов (новых культур

клеток) для дальнейших исследований. В то же время, полученные новые культуры детально исследованы, проведен анализ экспрессии ряда генов, проанализирована чувствительность культур к химиопрепаратам, проведен анализ способности клеток формировать опухоли у мышей. Автором разработан метод получения культур клеток из опухолей с использованием «импульсной гипоксии». Полученные культуры опухолевых клеток могут быть использованы как модели для изучения специфики изменения сигнальных путей в раковых клетках. 3 опухолевые культуры клеток молочной железы формируют опухолевый узел на иммунодефицитных мышцах линии SCID, в том числе и метастазирующую опухоль, такие культуры можно считать моделями максимально приближенными к реальным моделям опухолей.

Оценка содержания диссертации

Диссертационная работа построена по традиционному плану и состоит из списка сокращений, введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения, выводов и списка процитированной литературы. Диссертация изложена на 173 страницах, включает 38 рисунков, 3 схемы и 15 таблиц и 326 источников цитируемой литературы.

Во введении автор описал научную проблему, обозначил её актуальность, конкретизировал цель и задачи работы, охарактеризовал её значимость и привёл положения, выносимые на защиту.

Обзор литературы состоит из 3 подразделов и посвящён процессам эпителиально-мезенхимального (ЭМП) и мезенхимально-эпителиального (МЭП) перехода клеток при опухолевой прогрессии, а также содержит сведения о методах получения и способах культивирования клеток человека из нетрансформированной и опухолевой ткани. Всего обзор литературы содержит информацию из 251 источников, значительная часть из которых представлена работами последних нескольких лет, и в достаточной степени освещает суть поднятой проблемы и её актуальность.

В главе «Материалы и методы» приведен перечень реагентов и подробно описаны методы, использованные в исследовании. Данная глава позволяет получить представление о многообразии использованных в работе методов и не оставляет сомнений в их воспроизводимости.

Раздел «Результаты и обсуждение» составлен из 6 подразделов. Подраздел 1 посвящен разработке новых методов получения первичных культур клеток эндометрия и молочной железы. Всего в работе получено 5 опухолевых культур клеток эндометрия и 12 культур клеток молочной железы. Показано, что предложенный автором метод «импульсной гипоксии» имеет решающее значение для перехода фибробластоподобных культур в эпителиоподобные. Подраздел 2 посвящен молекулярным характеристикам полученных культур клеток эндометрия и молочной железы. Полученные культуры клеток эндометрия, описаны как гормон-зависимые, а культуры клеток молочной железы представлены преимущественно гормон-независимыми. Примечательно, что культуры опухолевых клеток эндометрия сохраняли профиль экспрессии рецепторов стероидных гормонов исходных опухолей, а полученные культуры молочной железы утрачивают экспрессию рецепторов стероидных гормонов, что, безусловно ставит вопрос об адекватности использования таких культур как полноценных моделей исходных опухолей. Экспрессия маркеров эпителиально-мезенхимального перехода строго коррелирует с морфологией клеток молочной железы: фибробластоидные клетки демонстрируют высокую экспрессию Mel-CAM и N-кадгерин с низкой экспрессией EpCAM и E-кадгерином, тогда как эпителиальные клетки демонстрируют «обратный» фенотип с низкой экспрессией Mel-CAM и N-кадгерином и высокой экспрессией EpCAM и E-кадгерина. В 3 подразделе описывается анализ чувствительности полученных культур клеток к противоопухолевым препаратам. Показано, что клетки, обладающие фибробластоподобной морфологией, проявляют резистентность к исследуемым лекарственным препаратам. Также показано, что базовый уровень мРНК IFIT3 в клетках

культур молочной железы человека может отражать чувствительность клеток к иммуномодуляторам. В подразделе 4 изложены результаты экспериментов *in vivo*. Три первичных культуры клеток молочной железы инициируют образование опухолей у иммунодефицитных мышей. Получена опухолевая модель молочной железы человека, проявляющая резистентность к лечению цисплатином, а также получена метастазирующая опухолевая модель в лимфатические узлы средостения. В подразделах 5 и 6 представлен анализ и ультраструктура туморогенных опухолевых клеток молочной железы. Показано, что клетки имеют фенотип малодифференцированных опухолевых клеток с псевдотриплоидным набором хромосом и множественными перестройками.

Суммируя вышесказанное, диссертация, несмотря на ряд допущенных опечаток, написана логично и ясно; достоверность полученных результатов и сделанных из них выводов не вызывает сомнений.

Замечания

Диссертационная работа производит хорошее впечатление, однако не лишена недостатков, в частности:

1. Литературный обзор не сфокусирован на проблемах, которые исследовал автор. Значительная часть литературного обзора посвящена механизмам мезенхимально - эпителиального перехода, который имеет лишь косвенное отношение к работе. В обзоре обсуждаются особенности терапии злокачественных опухолей, хотя в экспериментальной работе это серьезнейшее медицинское направление не затронуто вовсе. В то же время в обзоре не приведены современные данные о существующих культурах клеток, полученных из опухолей человека, не упомянуты существующие общедоступные и локальные коллекции культур клеток, вовсе не обсуждаются последние данные по характеристике культур клеток (прежде всего, Cancer Cell Line Encyclopedia).

2. В литературном обзоре в разделе «молекулярно-генетическая классификация опухолей» приведена только недавно предложенная и пока еще экзотическая классификация опухолей молочной железы на основе структуры генома клеток опухоли. В то же время вовсе не упоминается рекомендованная ASCO и ESMO классическая классификация, основанная на экспрессии генов, кодирующих рецепторы, хотя, судя по обсуждению результатов (стр. 92) автор хорошо знаком с этой общепринятой классификацией.
3. Приведенные в работе данные по экспрессии мРНК ER α , ER β , PR и CYP19 базируются на нормировке на единственный референс – GAPDH. Учитывая наличие более 60 псевдогенов GAPDH в геноме человека и значительные реорганизации генома в клетках опухолей существует высокая вероятность колебаний уровня мРНК GAPDH от культуры к культуре, что может сильно исказить приведенные результаты. В то же время анализ экспрессии IFIT3 автором проведен совершенно корректно, с использованием трех референсов – GAPDH, HPRT, RNU6.

Приведённые замечания не снижают ценность работы и не влияют на общую положительную оценку диссертации.

Научная и практическая значимость результатов работы

Полученные клеточные культуры, охарактеризованные по молекулярным маркерам, вовлеченным в опухолевую прогрессию, являются востребованными моделями для исследования биологии онкологических заболеваний эндометрия и молочной железы, а также для тестирования новых противоопухолевых агентов. Описанный в диссертационной работе метод трансформации клеток от фибробластоподобных в эпителиоподобные и полученные таким образом парные культуры клеток существенны для исследования молекулярных механизмов ЭМП и МЭП при опухолевой

прогрессии. Практическую значимость для исследования молекулярных механизмов метастазирования опухолей молочной железы и тестированию антиметастатических агентов имеет полученная метастазирующая опухолевая модель. Результаты работы могут представлять интерес для организаций, занимающихся исследованиями в смежных областях, в частности для Института фундаментальной и клинической иммунологии, Института молекулярной и клеточной биологии СО РАН, НИИ онкологии Томского научного центра СО РАМН и других организаций, изучающих молекулярно-генетические механизмы опухолевой прогрессии и осуществляющих поиск новых терапевтических мишеней при злокачественных опухолях молочной железы и эндометрия.

Заключение

Диссертационная работа Анны Андреевны Нуштаевой «Культуры онкотрансформированных клеток молочной железы и эндометрия для изучения опухолевой прогрессии и разработки терапевтических подходов», представленная к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – «молекулярная биология», является законченной работой, выполненной современными методами, отвечает всем требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Основные результаты работы опубликованы в 3 статьях в реферируемых научных изданиях и представлены на научных конференциях. Автореферат полностью соответствует основным положениям диссертационной работы. Представленная диссертационная работа соответствует требованиям пункта 9 «Положения о присуждении учёных степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, так как в ней решена научная задача, имеющая важное значение для изучения особенностей опухолевой прогрессии эндометрия и молочной железы на

клеточных моделях, а её автор, Нуштаева Анна Андреевна, заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

Отзыв на диссертационную работу Анны Андреевны Нуштаевой подготовлен доктором биологических наук Сергеем Петровичем Коваленко, обсужден и утвержден на заседании межлабораторного семинара отдела экспериментального моделирования и патогенеза инфекционных заболеваний ФИЦ ФТМ (протокол №9 от 22 мая 2019 года).

Руководитель Лаборатории молекулярной генетики
ФИЦ ФТМ, доктор биологических наук


Коваленко Сергей Петрович

Личную подпись	<i>Коваленко С.П.</i>
Заверяю	<i>Михеева О.В.</i>
Начальник отдела кадров	
«05» 06	2019 г.

