

ОТЗЫВ

официального оппонента диссертации Нуштаевой Анны Андреевны по теме: «Культуры онкотрансформированных клеток молочной железы и эндометрия для изучения опухолевой прогрессии и разработки терапевтических подходов», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности: 03.01.03 – молекулярная биология.

Актуальность темы исследования

Рак молочной железы (РМЖ) и рак матки (РМ) являются ведущей причиной женской онкологической смертности, а в популяции в целом занимает второе место по летальности после рака легкого. Пятилетняя выживаемость при РМЖ составляет 66%; даже спустя пять и более лет у пациентов, перенесших это заболевание, могут наблюдаться отдаленные метастазы. Медиана выживания пациентов с РМЖ, у которых детектированы множественные отдаленные метастазы составляет 2 года. Тяжесть клинических проявлений, а также отсутствие эффективных методов лечения и профилактики множественных метастазов делает крайне актуальной разработку и испытание новых терапевтических технологий. Вторая по значимости группа женских онкологических заболеваний — опухоли половой системы суммарно (РМ, рак шейки матки, рак яичника) по частоте, летальности и инвалидизации в некоторых странах даже опережают РМЖ.

Очевидно, что доклинические испытания способов терапии и/или профилактики как первичной опухоли, так и метастазов при РМЖ и РМ могут быть эффективны только при наличии адекватной модели, сопровождающейся полиорганном метастазированием. И вот тут в экспериментальной онкологии начинаются проблемы. Существующие модели либо используют линии рака молочной железы мелких лабораторных животных (например, линия карциномы 4Т1 у мышей), но в таком случае следует говорить о разработке технологий лечения рака грызунов, а не человека, либо применяют иммортализованные линии РМЖ человека, полученные десятилетия назад. Очевидно, что по своему паттерну генетической экспрессии и репертуару рецепторов эти линии лишь крайне отдаленно напоминают первичный РМЖ. Вот почему в настоящее время очень актуально исследование первичных опухолей у конкретных пациентов, вплоть до создания персонифицированных «аватаров» опухоли у иммунодефицитных

животных и в системах «*tumor on chip*». В свете концепции персонифицированного подбора средств терапии РМЖ и РМ, работа А.А. Нуштаевой, посвященная оптимизации способов получения первичных опухолевых культур вполне актуальна.

Общая характеристика работы

Диссертация А.А. Нуштаевой написана на русском языке и построена традиционно. Она состоит из Введения, глав: «Обзор литературы», «Экспериментальная часть», в которой описаны материалы и методы, «Результаты и их обсуждение», Заключение, выводов и списка литературы. Диссертация изложена на 171 странице, иллюстрирована 38 рисунками, содержит 15 таблиц и 326 источников литературы.

Цель работы сформулирована как «разработка методов получения первичных культур клеток из онкотрансформированной и нетрансформированной ткани молочной железы и эндометрия человека как моделей для изучения специфических молекулярных маркеров и фенотипических особенностей, обеспечивающих создание опухолевых и метастатических моделей на животных».

Задачи, поставленные автором для достижения цели, включают получение первичные культуры клеток из нормальной и опухолевой ткани молочной железы и эндометрия человека; иммунофенотипирование (оценку молекулярных маркеров мезенхимально-эпителиального перехода, рецепторов эпидермального фактора роста и маркеров РСК), исследование чувствительности клеток полученных культур к лекарственным агентам *in vitro*, а также изучение туморогенности этих клеток *in vivo*.

В обзоре литературы, написанном хорошим академическим языком, автор подробно анализирует существующие методы получения первичных культур опухолей, начиная от создания линии HeLa и работ Хейфлика, до современных методов получения трехмерных васкуляризированных структур, а также получения химиорезистентных культур и изучения механизмов химиорезистентности. Проводится анализ современного состояния таргетных подходов к терапии, и роли эпителиально-мезенхимального перехода в опухолевой прогрессии.

В «Материалах и методах» исчерпывающе изложены методы клеточной и молекулярной биологии которые автор применила для получения первичных

клеточных культур, их иммунофенотипирования, пробоподготовки и анализа паттернов экспрессии генов.

Раздел «Результаты и обсуждение» последовательно, в соответствии с перечнем поставленных задач описывает полученные автором собственные данные. Значительный раздел «Результатов» посвящен анализу молекулярного профиля первичных культур и исследованиям их индивидуальной химиорезистентности, что на мой взгляд является самым интересным аспектом работы. Методами ПЦР в реальном времени, проточной цитометрии, иммуоцитохимического анализа и вестерн блота проанализирована экспрессия таких маркеров, как: ER α , ER β , PR, HER2 -3, Ki67, виментин, E- и N-кадгерин. Выводы диссертации обоснованы и подтверждены имеющимися результатами.

Научная новизна диссертационной работы А.А Нуштаевой заключается в том, что впервые показано, что «импульсная гипоксия» индуцирует в культуре клеток рака молочной железы эпителиально-мезенхимальный переход. Также в работе впервые показано, что базовый уровень мРНК IFIT3 в клетках культур молочной железы человека может отражать чувствительность клеток к иммуностимулирующим препаратам.

Научно практическая значимость работы заключается в том, что ее результаты могут быть применены для разработки персонализированных методов опухолевой терапии, а также для фундаментальных исследований опухолевой прогрессии.

Замечания

1. С какой целью в названии и тексте диссертации автор использует сложное слово «онкотрансформированный» вместо общепонятного термина «опухолевый»? Если это дань научной моде – почему в тексте употребляются слова «бессмертный» вместо общепринятого «иммортиализованный», «загрязненный» вместо «контаминированный» (когда речь идёт именно о контаминации клеточной культуры другими клетками)?
2. Почему автору не удалось получить культуры клеток с эпителиальным фенотипом при ферментативной диссоциации? При этом, даже в собственном обзоре автор приводит данные о том, что энзиматическая обработка 1% коллагеназой в течение часа позволяет получать эпителиальные культуры из биоптатов рака легкого (ссылка [35], с.17). Может быть, все дело в неправильно

подобранной концентрации и времени инкубации с коллагеназой? Очевидно, что для солидных опухолей эта концентрация должна быть выше, чем для железистых. 2000 – 1500 Ед/мл при инкубировании 15 часов – это чрезвычайно много для железистых клеток, они могли попросту «перевариться». На самом деле, как мне представляется, тот или иной конечный фенотип первичной опухолевой культуры определяется тем, из какого дифферона происходят наиболее пролиферативно активные клоны опухолевых клеток.

3. В чём заключается модификация механической диссоциации? Корректно ли в разделе «Научная новизна» говорить о разработке нового метода получения клеточных культур – на основе механической диссоциации, метода, который существует по крайней мере сто лет – в различных модификациях?
4. В чем научная новизна получения 5 новых культур клеток эндометрия и 12 новых культур клеток молочной железы человека? Это сугубо методические аспекты, которые следовало бы исключить из раздела «Новизна».
5. Корректно ли говорить о разработке нового метода «импульсной гипоксии»? Метод существует десятки лет. Правильнее было бы сказать о том, что впервые показано, что импульсная гипоксия запускает мезенхимально-эпителиальный переход.
6. В Положениях, выносимых на защиту читаем: «Разработан метод получения <...> культуры клеток <...> с эпителиоподобным или мезенхимальноподобным фенотипами». Что такое «мезенхимальноподобный фенотип»? О каком диффероне в данном случае идёт речь? Я бы употребил в данном случае термин фибробластоподобный фенотип.
7. В разделе Результаты дословно дублирована методика диссоциации биоптатов опухолей молочной железы из раздела «Материалы и методы» (с. 79 и 68 соответственно).
8. Не увидел в диссертации иммуноцитохимического (цитофлюориметрического) подтверждения полученных методом ОТ-ПЦР данных по экспрессии генов ER α , ER β , PR и Сур19, как это сделано, например, для Ki67.
9. Не вполне понятно, удалось ли автору в конечном итоге достоверно определить, происходят ли полученные первичные культуры BrC4f и BrC6f, имеющие фибробластоподобный фенотип, из опухоль-ассоциированных фибробластов или из клеток аденокарциномы, подвергшихся эпителиально-мезенхимальному переходу. На мой взгляд, убедительно продемонстрировать

это можно, лишь подтвердив в полученных культурах одну из мутаций исходной опухоли (например, в гене BRCA1).

10. Не является ли тот факт, что уровень белка Ki-67 оказался выше в полученных эпителиальных культурах по сравнению с фибробластоподобными культурами, доказательством того, что в последнем случае автором получены не первичные культуры опухоли, а культуры опухоль-ассоциированных фибробластов?
11. Интересен выявленный автором феномен МЭП фибробластоподобных клеточных линий, полученных из опухолей молочной железы под действием импульсной гипоксии. Однако, непонятно, характерен ли этот феномен только для опухолевых клеток или точно так же МЭП может произойти, например, в нормальных или опухоль-ассоциированных фибробластах?
12. Существуют различные точки зрения на субпопуляцию клеток, имеющих фенотип CD44+CD24- в солидных аденокарциномах, поэтому я хотел бы предостеречь автора от однозначного употребления термина «опухолевые стволовые клетки» - в отношении этой субпопуляции.
13. Интересны результаты, полученные автором по цитостатическому действию рекомбинантного аналога лактапина RL2 в экспериментах *in vitro*. Есть ли основания предполагать, что противоопухолевый эффект RL2 будет столь же выражен *in vivo*?
14. Что служило негативным контролем туморогенности в экспериментах *in vivo* при имплантации культур опухолевых клеток эндометрия и молочной железы мышам линии SCID?
15. Почему только три клеточные линии опухолей молочной железы (BrC3e, BrCCh2e и BrCCh4e) показали туморогенность в экспериментах *in vivo*?

Перечисленные замечания являются либо методическими/оформительскими, либо имеют дискуссионный характер и не влияют на общее положительное впечатление от диссертации А.А. Нуштаевой и на научно-практическую ценность полученных в работе результатов.

Заключение

Диссертация Нуштаевой Анны Андреевны «Культуры онкотрансформированных клеток молочной железы и эндометрия для изучения опухолевой прогрессии и разработки терапевтических подходов» является законченным научно-квалификационным трудом, имеющим очевидное научно-практическое значение и добавляющим новые данные в области исследования молекулярного профиля индивидуальных опухолевых линий. Полученные в работе данные могут быть применены для разработки инновационных подходов по персонифицированной противоопухолевой терапии. Диссертация удовлетворяет требованиям Положения ВАК РФ п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» (утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842), предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени кандидата биологических наук, а её автор, Анна Андреевна Нуштаева, заслуживает присуждения искомой степени по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

Баклашев Владимир Павлович



«3» июня 2019

Заместитель генерального директора по научной работе и медицинским технологиям, доктор медицинских наук

ФГБУ "Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий ФМБА России" (ФГБУ ФНКЦ ФМБА России)

Почтовый адрес учреждения: 115682, г. Москва, Ореховый бульвар д. 28

Телефон: +74953956207

E-mail: info@fnkc-fmba.ru

Подпись Баклашева Владимира Павловича

Заверяю:

Заместитель исполнительного директора

По управлению персоналом



Т.М. Ильина