

официального оппонента на диссертационную работу Нуштаевой Анны Андреевны «Культуры онкотрансформированных клеток молочной железы и эндометрия для изучения опухолевой прогрессии и разработки терапевтических подходов», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – «молекулярная биология»

Диссертационная работа А. А. Нуштаевой находится в ряду одного из **актуальных научных направлений**, связанных с глобальной проблемой создания адекватных моделей злокачественных опухолей человека и на их основе поиска новых молекулярных маркеров для разработки соответствующей таргетной терапии. Поскольку общим феноменом для всех злокачественных опухолей является беспрецедентная гетерогенность (у разных пациентов, динамическая гетерогенность в одной и той же опухоли в процессе прогрессии, метастазирования и лечения, гетерогенность опухолевого микроокружения и метастатических ниш и т. п.), очевидно, что расширить панель молекулярных маркеров можно путем изучения большого разнообразия моделей. В связи с этим задачами научного исследования А.А. Нуштаевой были получение первичных культур клеток из опухолевой ткани молочной железы и эндометрия, характеристика паттерна молекулярных маркеров и оценка туморогенности полученных культур в экспериментах на животных.

**Научная и практическая значимость, а также новизна** исследования А. А. Нуштаевой заключаются в том, что ею получены и охарактеризованы 5 опухолевых культур эндометрия и 12 молочной железы человека, которые могут быть использованы и другими исследователями, работающими в области изучения механизмов опухолевой прогрессии, скрининга новых противоопухолевых химиопрепаратов и, вообще, клеточной биологии. Арсенал клеточных культур пополнился новыми моделями: аутокринно регулируемой гормонозависимой, чувствительной к интерферону альфа, лимфогенно метастазирующей и химиорезистентной опухолями. Особо следует отметить разработанный автором метод «импульсной гипоксии», индуцирующий в культуре эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП), что сделало возможным охарактеризовать специфические маркеры этого процесса. Созданные автором работы новые клеточные модели, на которых реализуется ЭМП и мезенхимально-эпителиальный переход (МЭП)

безусловно вносят конкретный вклад в расшифровку молекулярных каскадов, обеспечивающих инвазию и метастазирование опухолей.

**Диссертация** изложена на 173 страницах, написана по традиционной схеме, имеет все необходимые разделы: введение, обзор литературы, описание материалов и методов, результаты и их обсуждение, выводы, список цитируемой литературы (326 наименований). Включает 38 рисунков, 3 схемы и 15 таблиц.

**В обзоре литературы** автором диссертационной работы, прежде всего, всесторонне описаны методы культивирования клеток млекопитающих, в том числе получение первичных опухолевых культур человека. Привлекательно, что при этом высказано критическое отношение к преимуществам и недостаткам разных методов культивирования, так что становится понятным, почему в данной работе для решения поставленных задач применен именно метод 2D культур. Главная часть **Обзора литературы** посвящена описанию механизмов эпителиально-мезенхимального и мезенхимально-эпителиального переходов, процессов, являющихся нормальной формой пластичности эпителия, играющих роль в формировании зародышевых слоев и миграции клеток в эмбриогенезе позвоночных. Молекулярные механизмы ЭМП в эмбриогенезе сходны с таковыми при онкогенезе. Опухоль использует этот механизм для приобретения эпителиальными клетками подвижности и инвазивности, что проявляется формированием метастазов. В описании этой части обзора автор проявила глубокие знания существа ЭМП. Хорошо изложена регуляция процесса и критические точки, могущие служить мишенями для воздействия на опухоль, а также таргетные подходы для предотвращения ЭМП. В **Обзоре литературы** представлены также данные об опухолевых стволовых клетках. В основном рассматривается их пластичность в отношении ЭМП и ассоциация с инвазивностью опухоли, способностью образовывать метастазы и резистентностью к химиотерапевтическим препаратам. Таким образом, приведенный в работе обзор литературы в достаточной мере вводит в изучаемую проблему.

В главе **Материалы и методы** подробно описаны имеющиеся в распоряжении автора исследования материалы: иммортализованные коллекционные клеточные культуры ряда аденокарцином, иммунодефицитные мыши аутбредной линии SCID. Примененные в работе методы характеризуют комплексный методический подход, объединяющий и биохимические методы, и методы клеточной биологии, а также методы молекулярной генетики и экспериментальной онкологии. Одно лишь

перечисление методов свидетельствует о том, что работа выполнена на высоком методическом уровне, отвечающем мировым стандартам.

А. А. Нуштаевой в ходе проведения исследования получены **результаты, имеющие фундаментальное и практическое значение.**

При получении первичных жизнеспособных культур из биоптатов, взятых от пациентов, автором применены некоторые модификации метода, в частности, разработанный ею метод импульсной гипоксии, в результате чего удалось получить и эпителиоподобные и фибробластоподобные опухолевые культуры молочной железы и эндометрия. Далее был изучен молекулярный профиль полученных культур по ряду маркеров, среди которых рецепторы эстрогена и прогестерона, рецепторы семейства эпидермального фактора роста, маркеры пролиферации и синтеза эстрогенов, маркеры ЭМП и стволовых опухолевых клеток. В результате одни опухолевые линии можно было отнести к гормонозависимым, другие к гормоннезависимым. Для культур эпителиального и мезенхимального типов обнаружены соответствующие паттерны маркеров.

Изучение чувствительности опухолевых культур молочной железы к терапии выявило ассоциацию устойчивости к действию широкого спектра изученных химиопрепаратов с мезенхимальными маркерами. Найден маркер чувствительности опухолевой культуры к ИНФ альфа – базальный уровень интерферонзависимого белка IFIT3.

Логическим продолжением культуральной части работы было проведение экспериментов *in vivo*. Туморогенность полученных культур изучена на иммунодефицитных мышах SCID. Результат оценивали по обнаружению пальпируемой опухоли. Только три культуры опухоли молочной железы образовали солидные узлы на месте подкожной трансплантации. Все они имели эпителиоидный фенотип по маркерам и по морфологии. Одна из них оказалась к тому же метастазирующей – ценной моделью для изучения процесса метастазирования и влияния на него.

Основные результаты диссертационной работы опубликованы А. А. Нуштаевой в рецензируемых изданиях. Содержание автореферата соответствует содержанию и основным выводам диссертации.

#### **Замечания:**

1. Поскольку диссертационная работа А. А. Нуштаевой имеет несомненную практическую направленность, было бы весьма желательным на основании имеющегося в работе материала проследить изменение исследованных маркеров в биоптатах

опухолей, полученных первичных культурах опухолевых клеток и в солидных опухолях мышей.

2. Вызывает удивление, почему при тестировании на чувствительность к противоопухолевым агентам так мало внимания уделено рекомбинантному лактаптину, препарату, который разработан в данной лаборатории и для которого ранее показан апоптогенный эффект в отношении опухолей молочной железы. Было бы весьма актуально среди полученных первичных опухолевых культур найти чувствительные к апоптогену и описать их маркеры

3. Вывод о том, что базальный уровень экспрессии интерферонзависимого белка является маркером чувствительности опухоли к иммуномодуляторам вообще, представляется мне экспансивно необоснованным.

**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 методами на уровне мировых стандартов, отвечает всем требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – «молекулярная биология», а А. А. Нуштаева заслуживает присуждения искомой степени.

#### **Официальный оппонент:**

Старший научный сотрудник

Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (ИЦиГ СО РАН)

кандидат биологических наук

*Попова*



Попова Нелли Александровна

Дл. 23 мая 2019  
документов

**Подпись заверяю:**

Адрес: 630090, Новосибирск, Россия, пр. ак. Лаврентьева, 10

Телефон: +7 (383) 363-49-63\*5216

сайт: <http://www.bionet.nsc.ru> e-mail: [nelly@bionet.nsc.ru](mailto:nelly@bionet.nsc.ru)

