

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

кандидата биологических наук

Логашенко Евгении Борисовны на диссертационную работу

Троицкой Ольги Сергеевны

«Исследование способности потенциальных противоопухолевых агентов индуцировать иммуногенную гибель клеток», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – Молекулярная биология

Актуальность темы исследования

Иммунотерапия, в настоящее время, является одной из быстро развивающихся областей терапии онкологических заболеваний. При этом используемый противоопухолевый препарат, с одной стороны, напрямую индуцирует гибель большинства раковых клеток, а с другой стороны, погибающие клетки активируют иммунную систему, формируя специфический иммунный ответ на опухолевые антигены, что ведет к уничтожению оставшихся опухолевых клеток. Таким требованиям удовлетворяют индукторы иммуногенной клеточной гибели, к которым относят противоопухолевые препараты с различными молекулярными механизмами действия: некоторые традиционные химиопрепараты, белковые агенты, онколитические вирусы, а также фотодинамическую и радиотерапию. Гибель клеток по иммуногенному типу способствует формированию адаптивного противоопухолевого иммунного ответа аналогично вакцинации, что способствует элиминации метастазирующих опухолевых клеток, или опухолевых клеток, не попавших под прямое воздействие лекарства, клетками иммунной системы. Поэтому, терапевтические индукторы иммуногенной клеточной гибели могут иметь преимущество как в борьбе с метастазирующими опухолями, так и для разработки подходов противоопухолевой иммунизации.

Диссертационная работа Троицкой Ольги Сергеевны, посвященная исследованию и сравнению эффективности индукции иммуногенного типа клеточной гибели новых потенциальных противоопухолевых препаратов на основе аналога лактапина и подхода для противоопухолевой терапии с использованием струи холодной плазмы, является, несомненно, актуальным исследованием.

Научная новизна, теоретическая и практическая значимость исследования.

Впервые проведен анализ эффективности индукции иммуногенной клеточной гибели в опухолевых клетках человека при использовании трех различных потенциально иммуногенных противоопухолевых агентов: аналога лактапина RL2, рекомбинантного вируса осповакцины VV-GMCSF-Lact, кодирующего GM-CSF человека и лактапин, и

холодной плазменной струи (ХПС) и показано, что: рекомбинантный аналог лактапина RL2 вызывает гибель опухолевых клеток по иммуногенному типу, а трансплантация таких гибнущих клеток сингенным мышам оказывает вакцинирующий противоопухолевый эффект, при этом использование ингибитора индоламин-2,3-диоксигеназы при приводит к усилению противоопухолевого эффекта. Впервые была показана способность рекомбинантного вируса VV-GMCSF-Lact и облучения ХПС индуцировать гибель опухолевых клеток с признаками иммуногенной гибели *in vitro*. Сравнение уровня и динамики активации маркеров иммуногенной клеточной гибели в обработанных указанными индукторами клеток показало, что наиболее эффективным индуктором иммуногенной гибели и активатором эффекта вакцинации является аналог лактапина RL2.

Практическая значимость работы состоит в том, что полученные данные об особенностях индукции гибели опухолевых клеток под действием рекомбинантного аналога лактапина RL2 и рекомбинантного вируса осповакцины VV-GMCSF-Lact, кодирующего лактапин, закладывают практическую основу для направленной разработки новых противоопухолевых агентов на основе лактапина, а также для внедрения этих подходов в клиническую практику.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов исследования и их обсуждения, выводов и списка использованной литературы. Работа изложена на 155 страницах, содержит 46 рисунков и 4 таблицы. Список литературы включает 258 литературных источников.

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

Литературный обзор полностью раскрывает мировую значимость исследований Троицкой Ольги Сергеевны, которым посвящена диссертационная работа, а именно, дается материал об иммуногенной клеточной гибели, подробно обсуждаются известные на данный момент механизмы ее индукции. Дается характеристика основным молекулярным событиям, позволяющим отнести гибель клеток именно к иммуногенной, а именно: экспозиция кальретикулина и белка теплового шока HSP70 на внешнюю плазматическую мембрану клетки и высвобождение HMGB1 и АТФ в межклеточное пространство. Рассматриваются различные классы препаратов, способных вызывать иммуногенную гибель: химиотерапевтические препараты, пептиды, обладающие противоопухолевой

активностью, онколитические вирусы. Также рассматриваются и физические способы индукции.

Глава «Экспериментальная часть» изложена на 17 страницах, где автор работы приводит подробное описание всем подготовительным процессам для проведения исследований, дает характеристику использованных реактивов, используемых клеточных линий, подробное описание современных методов *in vitro* и *in vivo*, приборной базы. Все это позволяет оценить масштабность, объем и уровень проведенных исследований.

В главе «Результаты и обсуждение» содержится изложение полученных результатов и аргументированный анализ их в сравнение с литературными источниками.

Хотелось остановить внимание на отдельных и важных результатах, полученных при исследованиях, как *in vitro*, так и *in vivo*.

Было установлено, что рекомбинантный аналог лактапина RL2 индуцирует гибель опухолевых клеток с признаками иммуногенного типа гибели *in vitro* и вызывает изменения в опухолевых клетках, ведущие к их захвату антигенпрезентирующими клетками, стимулируя в них экспрессию МНС II. Исследование активации маркеров иммуногенной гибели опухолевых клеток при воздействии рекомбинантного аналога лактапина RL2 проводилось на трех линиях опухолевых клеток человека и мыши - аденокарцинома молочной железы человека MDA-MB-231, MCF-7 и рабдомиосаркома мыши MX-7. Далее в работе объектами исследованиями в экспериментах *in vivo* были клетки MX-7, поскольку именно они являются опухоленными при трансплантации сингенным иммунокомпетентным мышам. Гибнущие опухолевые клетки, обработанные аналогом лактапина RL2, обладают противоопухолевым вакцинирующим эффектом *in vivo*, при этом вакцинация суммарным пулом RL2-обработанных клеток оказывает больший вакцинирующий эффект, чем вакцинация только клетками в состоянии позднего апоптоза/некроза. Некоторое усиление противоопухолевого вакцинирующего эффекта было достигнуто ингибированием фермента индоламин-2,3-диоксигеназы этилпириватом. Продemonстрировано, что рекомбинантные вирусы осповакцины при заражении опухолевых клеток также вызывают изменение молекулярных маркеров иммуногенной гибели *in vitro*, однако без реализации противоопухолевой вакцинации *in vivo*. Индукция активации маркеров иммуногенной клеточной гибели *in vitro* происходит и при использовании такого физического способа, как облучение опухолевых клеток холодной плазменной струей. Показано, что облучение зоны опухоли у мышей холодной

плазменной струей ведет к повышению концентрации белка HMGB1 в сыворотке крови животных.

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 подходов, соответствующих поставленным задачам. Автореферат диссертации соответствует ее содержанию.

Результаты данного исследования широко апробированы на российских и международных конференциях, по теме диссертации опубликовано 4 работы.

В работе можно отметить некоторое количество замечаний.

В главе Результаты и обсуждения в разделе *Анализ активации маркеров иммуногенной гибели опухолевых клеток при воздействии рекомбинантного аналога лактамина RL2 in vitro* сначала приводятся доказательства того, что под действием RL2 не наблюдается увеличение суммарного уровня мРНК и белка кальретикулина, и только потом автор описывает эксперимент, показывающий увеличение доли клеток, содержащей кальретикулин на внешней мембране. Логичнее бы было привести эти эксперименты в обратном порядке.

В ряде случаев приводится обсуждение только половины результатов, приведенных на рисунках.

Во всей работе, приведенные рисунки выполнены в разном стиле и оформлении

Сделанные замечания имеют дискуссионный характер, не снижают научной ценности полученных результатов и сделанных выводов и ни в коей мере не умаляют хорошего впечатления от работы.

При прочтении работы возникли следующие вопросы:

Чем объясняются используемые концентрации потенциальных противоопухолевых агентов и условия обработки клеток перед вакцинацией? Могут ли наблюдаемые отличия в уровнях внеклеточного АТФ, а также в эффективности вакцинации быть связаны с разным количеством клеток, находящихся на разных стадиях апоптоза после обработки используемыми индукторами, а не с их различной способностью индуцировать иммуногенную гибель?

При исследовании действия ингибиторов индоламин-2,3-диоксигиназы (ИДО) специфического 1-метилтриптофана и неспецифического этилпирувата на эффективность вакцинации, было показано, что положительным влиянием на вакцинацию обладал только неспецифический ингибитор этилпируват. Не означает ли это, что наблюдаемый эффект вообще не связан с ИДО?

Каков смысл эксперимента по измерению про-и противо-воспалительных цитокинов в сыворотке крови лабораторных животных после облучения холодной плазменной струей? Какова связь уровня этих цитокинов с индукцией или ее отсутствием иммуногенной клеточной гибели?

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертация Троицкой Ольги Сергеевны «Исследование способности потенциальных противоопухолевых агентов индуцировать иммуногенную гибель клеток», выполненная под руководством доктора биологических наук Коваль Ольги Александровны 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 достижение в биохимии, молекулярной биологии. В диссертации решается актуальная проблема - исследование и сравнение эффективности индукции иммуногенного типа клеточной гибели новых потенциальных противоопухолевых препаратов на основе аналога лактапина и подхода для противоопухолевой терапии с использованием струй холодной плазмы.

В целом по актуальности темы, объёму, новизне полученных результатов и их научной и практической значимости представленная диссертация отвечает требованиям установленным Институтом химической биологии и фундаментальной медициной СО РАН к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 1.5.3 – Молекулярная биология, а также критериям определенным пп. 2.1–2.5 Положения о присуждении ученых степеней Института химической биологии и фундаментальной медициной СО РАН. Диссертация оформлена согласно Приложениям № 5, 6 Положения о диссертационных советах Института химической биологии и фундаментальной медициной СО РАН. Автор диссертации, Троицкая Ольга Сергеевна,

безусловно, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – Молекулярная биология

Официальный оппонент
кандидат биологических наук,
Старший научный сотрудник
Лаборатории биохимии нуклеиновых кислот
Федерального государственного бюджетного
учреждения Института химической биологии
и фундаментальной медицины
Сибирского отделения
Российской академии наук



Логашенко
Евгения Борисовна

630090, г. Новосибирск, проспект Академика Лаврентьева, д. 8
тел.: 8(383)363-51-61
e-mail: evg_log@niboch.nsc.ru

Подпись Е.Б. Логашенко
Заверяю Ученый секретарь ИХБФМ СО РАН
К.Х.Н.



Дарья Сергеевна Новопашина

20. 06. 2022