

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу

ДОЛГОВОЙ ЕВГЕНИИ ВЛАДИМИРОВНЫ

**«Интернализация двуцепочечной ДНК низкодифференцированными клетками
млекопитающих и использование этого свойства при лечении экспериментальных
опухолей»,**

представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по научной
специальности

1.5.22. Клеточная биология

Актуальность темы выполненной работы

В последнее время возрастающую значимость приобретает теория гетерогенного строения опухоли, заключающаяся в наличии опухолевых стволовых клеток (ОСК) в опухолевой ткани, несущих ответственность за устойчивость неоплазии к химиотерапии, метастазирование и возникновение рецидивов. Лечение онкологических заболеваний в итоге приводит к невозможности удалить всю совокупность ОСК благодаря их свойству ускользать от терапии и избегать иммунного ответа организма, что приводит к рецидивам.

В лечении онкологических заболеваний активно применяется молекулярная терапия опухолей с использованием нуклеиновых кислот, регулирующих экспрессию генов (антисмысловые олигонуклеотиды, siРНК) и участвующих в регуляции процессов репарации (дцДНК). Однако, проблема их интернализации тканеспецифичными клетками до сих пор требует решения с помощью специальных средств и систем доставки, тогда как низкодифференцированные клетки, к которым относятся и ОСК, потенциально могут быть способны к захвату нуклеиновых кислот. Вследствие этого изучение свойств ОСК, разработка новых методов их детекции, а также создание новых терапевтических подходов, в основе которых лежит таргетное воздействие на ОСК, являются крайне актуальными.

Работа Долговой Е.В. посвящена исследованию естественной интернализации фрагментов экстраклеточной двуцепочечной ДНК низкодифференцированными клетками, в первую очередь опухолевыми стволовыми клетками, и поиск режима воздействия на экспериментальные опухоли, в основе которого лежит указанное свойство.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа Долговой Е.В. построена по традиционной схеме и состоит из Введения, Обзора литературы, Материалов и методов исследований, Результатов исследования и их обсуждения, Заключение, Выводов и Списка литературы. Работа изложена на 386 страницах машинописного текста, содержит 56 рисунков и 16 таблиц. Список цитируемой литературы включает 465 источников.

Во введении автор обосновывает актуальность исследования, описывает степень разработанности темы диссертации, формулирует цели и задачи своей работы, оценивает

научную новизну, теоретическую и потенциальную практическую значимость результатов, излагает основные научные результаты соответственно опубликованным работам и личный вклад, формулирует положения, выносимые на защиту, описывает степень достоверности и апробацию результатов исследования.

Глава 1, содержащая обзор литературы, состоит из четырёх разделов. В них дается характеристика свойств опухоли; описываются особенности ОСК, как туморогенного начала неоплазии; характеристика взаимодействий эукариотической клетки и внеклеточных нуклеиновых кислот. Особое внимание уделено современным методам лечения онкологических заболеваний, включая таргетные методы воздействия на ОСК.

Глава 2, содержащая описание материалов и методов исследования, подробно описывает научно-методологические подходы, примененные автором для решения поставленных задач и достижения цели исследования. В исследовании используется широкий спектр экспериментальных опухолевых моделей животных и культур опухолевых клеток, биохимические, цитохимические, иммуногистохимические методы и методы молекулярной биологии. Все методики, использованные в исследовании, детально прописаны и пояснены.

Глава 3 посвящена описанию и обсуждению результатов исследования механизма интернализации экстраклеточной дцДНК в низкодифференцированные клетки различного генеза (ГСК, ОСК) природным механизмом без использования трансфецирующих факторов. Автором описываются механизмы, влияющие на протекание репаративных процессов в ОСК, и приводятся результаты лечения животных, несущих экспериментальные опухоли, в соответствии с терапевтическим режимом «Каранахан», в основе которого лежит хронометрическое синергичное воздействие кросслинкирующего цитостатика и сложнокомпозиционного препарата двуцепочечной ДНК.

Описанные результаты проиллюстрированы многочисленными рисунками и таблицами. Диссертация снабжена обширным Заключением, в которых автор обсуждает и анализирует результаты своей работы.

Достоверность полученных результатов подтверждается статистической обработкой данных с использованием корректно подобранных критериев и тестов. Выводы основываются на фактически полученном автором материале и отражают суть проведенного экспериментального исследования. Автор выносит на защиту четыре научных положения, логично вытекающих из анализа результатов исследования. Обоснованность научных положений и выводов, таким образом, не вызывает сомнений. Материал, представленный в диссертации, получен и проанализирован автором исследования лично либо при его непосредственном участии.

Научная новизна и научно-практическая значимость полученных результатов

Впервые показано, что опухолевые стволовые клетки интернализуют фрагменты внеклеточной дцДНК благодаря особенностям клеточной мембраны, обеспечивающим их

электростатическое связывание и формирование ковалентных контактов с ДНК, с последующей интернализацией механизмами клатрин- и/или кавеолинзависимого эндоцитоза и макропиноцитоза. Показано, что ОСК имеют общий положительный заряд клеточной мембраны за счет присутствия в составе протеогликанов/гликопротеинов, скавенджер-рецепторов и гликозилфосфатидилинозитол-заякоренных белков, которые несут в своем составе положительно заряженные сайты связывания гепарина/полианионов/молекул дцДНК.

На основе способности ОСК интернализировать экстраклеточную дцДНК впервые разработан режим воздействия на злокачественные новообразования «Каранахан» («убивающий причину», санскрит), что является практической значимостью настоящей работы. Режим воздействия «Каранахан» включает в себя трехкратные малодозовые хронометрические обработки клеток кросслинkerующим цитостатиком (циклофосфамид, митомицин С), зависящие от продолжительности цикла репарации клеток конкретной опухоли, и введение сложнокомпозиционного препарата дцДНК в точку демаркации двух этапов репарации: эксцизионной репарации нуклетотидов и гомологичной рекомбинации.

Достоверность и обоснованность результатов исследований

Достоверность полученных результатов обеспечена использованием широкого спектра современных методов, включая биохимические, цитохимические, иммуногистохимические методы и методы молекулярной биологии, детальным анализом полученных данных и корректными способами статистической обработки. Результаты диссертационной работы опубликованы в 41 статье в рецензируемых научных журналах, входящих в перечень ВАК, шести патентах, доложены и обсуждены на четырех российских и международных научных форумах и конференциях.

В работе можно отметить небольшое количество замечаний, а именно опечатки, неудачные выражения, излишне подробные экспериментальные детали в разделе Результаты.

При прочтении работы возникли следующие вопросы:

1. Вопрос к составу препарата ДНК-микс, применяемому в схеме лечения Каранахан: препарат ДНК состоит из нативной ДНК человека, нативной и модифицированной ДНК спермы лосося в соотношении 7:5:2 (или 50 %, 36 % и 14 %). Почему брали ДНК двух видов - *homo sapiens* и *salmo salar*?

2. Помимо ОСК в опухолевом окружении присутствует ряд клеток со способностью поглощать многие молекулы, включая и дцДНК, в частности макрофаги и нейтрофилы. Не повлияет ли присутствие этих клеток на снижение концентрации препарата дцДНК в ОСК и, соответственно, на эффективность терапии Каранахан?

3. Почему взята была именно последовательность Alu-повтора в TAMRA зонде? И имеется ли специфичность интернализации Alu-TAMRA зонда в ОСК в сравнении с ДНК-зондом другой последовательности?

Высказанные замечания и вопросы не затрагивают основных результатов и выводов диссертации и не снижают общего положительного впечатления от работы.

В целом, диссертационная работа Долговой Евгении Владимировны, по своей актуальности, научной новизне и практической значимости результатов, объему и глубине проведенных исследований, достоверности полученных результатов и полноте изложения результатов диссертации в опубликованных работах, является законченной самостоятельной научно-квалификационной работой, проведенной на высоком научно-методологическом уровне, в которой решена актуальная научная проблема – выяснен механизм естественной интернализации фрагментов экстраклеточной двуцепочечной ДНК опухолевыми стволовыми клетками и разработан режим «Каранакан», заключающийся в воздействии кросслинкующего цитостатика и сложного композиционного препарата лцДНК на ОСК, что приводит к их гибели и подавлению роста/рецидивов опухолей.

Диссертационная работа по своей актуальности, научной значимости и новизне полученных результатов соответствует п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 №842 (в текущей редакции), а ее автор - Долгова Евгения Владимировна заслуживает присуждения ей ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.22 – клеточная биология.

Доктор биологических наук
ведущий научный сотрудник
Лаборатории биохимии нуклеиновых кислот
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
«Институт химической биологии и фундаментальной медицины им. Д.Г. Кнорре»
Сибирского отделения Российской академии наук (ИХБФМ СО РАН).

Н.Л. Миронова

Подпись д.б.н. Н.Л. Мироновой заверяю:



Е.Б. Логашенко
М.П.

Ученый секретарь ИХБФМ СО РАН,
Кандидат биологических наук

25.09.2026