

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Долговой Евгении Владимировны на тему «Интернализация двуцепочечной ДНК низкодифференцированными клетками млекопитающих и использование этого свойства при лечении экспериментальных опухолей», представленной на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.22 – клеточная биология

Актуальность темы диссертационного исследования

Изучение опухолевых стволовых клеток (ОСК) кардинально изменило современную онкологию. В отличие от обычных раковых клеток, ОСК определяют эволюцию и персистенцию опухоли. Они определяют биологическую агрессивность опухоли, способность к бесконечному самообновлению и гетерогенность клеточной популяции. Исследования ОСК доказали, что ОСК выступают в качестве ключевых факторов, определяющих возникновение, прогрессирование, метастазирование опухолей и развитие резистентности к терапии. ОСК являются критически важными мишенями для улучшения результатов лечения рака. Разработка методов лечения, избирательно уничтожающих ОСК и не затрагивающих нейтральные стволовые клетки, представляет собой сложную задачу и, несмотря на прогресс в понимании биологии ОСК, серьёзной проблемой остаются эффективные терапевтические стратегии. Поэтому изучение свойств ОСК, разработка новых методов их детекции, а также создание новых терапевтических подходов, в основе которых лежит таргетное воздействие на ОСК, является **современной актуальной задачей** для прорыва в лечении онкологических заболеваний. Диссертационная работа Долговой Евгении Владимировны посвящена этой актуальной теме.

Научная новизна диссертационной работы Долговой Евгении Владимировны несомненна. Диссертационное исследование привело к получению значимых новых знаний в области изучения свойств ОСК, разработки новых методов их детекции, а также создание новых терапевтических подходов к лечению онкологических заболеваний.

В диссертационной работе открыто новое, ранее не известное свойство ОСК интернализировать ДНК, описан механизм указанного явления. На основе этого свойства ОСК разработана новая технология лечения злокачественных новообразований, основанная на комплексном воздействии на ОСК, клетки опухолевой стромы и иммунную систему хозяина, что в сумме позволяет вылечить экспериментальных животных от скоротечных злокачественных неоплазий как в асцитном, так и в солидном вариантах.

Впервые продемонстрировано новое уникальное свойство опухолевых стволовых клеток интернализировать фрагменты экстраклеточной двуцепочечной ДНК (дцДНК) естественным природным механизмом. Определено, что обладающие этим свойством клетки имеют особенности строения клеточной мембраны, позволяющие им на первом этапе электростатически, на втором – путем формирования прочных ковалентных/химических контактов связываться с фрагментами экстраклеточной дцДНК, и далее интернализировать эти фрагменты внутрь клетки механизмами клатрин- и/или кавеоло-зависимого эндоцитоза и макропиноцитоза. Определено одно из важнейших особенностей строения клеточной мембраны ОСК – наличие трех функциональных групп факторов клеточной оболочки: протеингликаны/гликопротеины, скавенджер рецепторы и гликозилфосфатидилинозитол-заякоренные белки.

Свойство интернализации экстраклеточных фрагментов представляет собой универсальную индикаторную характеристику ОСК. Сформировано новое представление о том, что на клеточной поверхности разных типов ОСК присутствуют различные представители указанных трех групп факторов, тем не менее обеспечивающих одинаковое свойство – интернализацию экстраклеточных фрагментов дцДНК.

Флуоресцентно меченый дцДНК зонд (*Alu*-TAMRA двуцепочечный фрагмент), использованный в работе, является новым универсальным маркером ОСК различных нозологий, благодаря чему возможно детектирование ОСК в общей массе опухолевых клеток.

В диссертационной работе предложены и развиты новые методологические подходы к лечению злокачественных заболеваний. На основе свойства интернализации экстраклеточной дцДНК опухолевыми стволовыми клетками разработан терапевтический режим таргетной элиминации ОСК («Каранахан»), включающий трехкратные малодозовые хронометрические обработки клеток опухоли кросс-линкирующим цитостатиком, зависящие от продолжительности цикла репарации двуцепочечных разрывов клеток конкретной опухоли, и введение сложнокомпозиционного препарата дцДНК в фазу демаркации двух этапов репарации - эксцизионной репарации нуклеотидов и гомологичной рекомбинации. Финальная, четвертая, обработка указанными препаратами в день синхронизации ОСК в чувствительную для воздействия фрагментов дцДНК фазу клеточного цикла (G1), приводит к элиминации ОСК из опухолевого очага и, как следствие, излечению экспериментальных животных от перевитых опухолей. Способ синхронизации ОСК в чувствительной для терапии фазе клеточного цикла является новым, ранее неизвестным.

Теоретическую значимость диссертационной работы, определяет описание нового биологического свойства ОСК – способности интернализировать естественным природным механизмом фрагменты экстраклеточной дцДНК.

Практическую значимость имеет обнаруженное в настоящей работе свойство интернализации ОСК экстраклеточных фрагментов дцДНК, и использование, в этой связи, флуоресцентно меченого ДНК зонда (*Alu*-TAMRA дцДНК зонд), маркирующего низкодифференцированные опухолевые клетки, Указанный ДНК зонд (или любой аналогичный по принципу зонд дцДНК) может являться универсальным маркером для детекции ОСК различных типов опухолей, для оценки эффективности используемой терапии в результате анализа изменения количества ОСК в опухоли и окружающих ее тканях.

Практическую значимость диссертационной работы, также определяет разработка нового подхода терапии злокачественных новообразований «Каранахан», основанной на таргетной элиминации ОСК, и его апробация на нескольких различных моделях опухолей мышей и модели глиобластомы человека U87

Анализ структуры и содержания работы

В целом диссертационная работа представляет собой солидное фундаментальное исследование. Логическая (и хронологическая) последовательность изложения материала диссертация помогает оценить эту фундаментальность и масштаб исследования. Диссертация состоит из введения, обзора литературы (Глава 1), материалов и методов (Глава 2), результатов и их (Глава 3), обсуждения (Глава 4), заключения, выводов, списка цитируемой литературы и приложений.

Во «**Введении**» описано современное состояние исследований в той области науки, в которой работает автор, перечислены проблемы, заслуживающие дальнейшего изучения, поставлены цели и задачи конкретного исследования, представленного в диссертационной работе, а также сформулированы основные положения, выносимые на защиту. Также излагается научная новизна, теоретическая и практическая значимость ценность работы, личный вклад автора и сведения об апробации результатов.

Глава 1 «Обзор литературы» представляет собой насыщенный информацией раздел диссертационного исследования, представленный семью подразделами, и не оставляет сомнения в компетентности автора.

Подраздел 1.1 посвящён характеристике опухоли, как ткани, причинам возникновения опухолевой клетки и отличиям опухолей от здоровых тканей организма. Описаны

современные представления организации опухоли как иерархической системы, в которой опухолевые стволовые клетки (ОСК) находятся на вершине этой иерархии и являются ответственными за развитие опухоли, инвазию и метастазирование, устойчивость к радио-/химиотерапии и возникновение рецидивов заболевания.

Подраздел 1.2 посвящён описанию особенностей ОСК и молекулярных сигнальных путей, обеспечивающих такие особенности, как поддержание плюрипотентности, асимметричное деление, эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП), аноиксис, и метастазирование, эффлюкс и детоксикация лекарственных средств и химио/радиоустойчивость, а также эффект Варбурга. Эти особенности определяют огромный потенциал выживаемости ОСК.

Подраздел 1.3 обзора посвящен характеристике источников экстраклеточной ДНК в организме, известным механизмам интернализации ДНК клетками и функциональной значимости экстраклеточной дцДНК.

В подразделах 1.4 и 1.5 описаны современные подходы к лечению злокачественных образований с акцентом на существующие таргетные методы, направленные на удаление ОСК, и проблемам такой терапии, связанными с поиском подходящих мишеней.

Подраздел 1.6 является заключением к главе 1, показывающем, что элиминация ОСК из очага опухолевого роста является приоритетной задачей практической онкологии.

В Подразделе 1.7 сделано краткое предисловие к представляемой работе

Все положения главы «Обзор литературы» подкреплены ссылками на оригинальные работы отечественных и зарубежных авторов.

Глава 2 «Материалы и методы» написана подробно, с указанием всех необходимых деталей использованных подходов и сведений о математической и статистической обработке данных. В этой главе представлено описание объектов исследования и модифицированных или разработанных автором методов.

Глава 3 «Результаты» разделена на 7 подразделов.

В Подразделе 3.1 приводятся результаты исследований, доказывающих, что экстраклеточная ДНК интернализуется в низкодифференцированные гемопоэтические стволовые клетки мышей. Во-первых, определён тип клеток в популяции клеток костного мозга, которые интернализуют фрагменты экстраклеточной дцДНК естественным природным механизмом. Во-вторых, проанализирован репаративный процессинг фрагментов линейаризованной плазмидной ДНК, находящейся внутри клетки, подтвердивший возможность влияния фрагментов экстраклеточной дцДНК на репаративный процесс.

В Подразделе 3.2. описывается формирование идеи исследования ОСК, основанной на данных о наличии негативного синергичного действия кросслинкующего цитостатика и фрагментов экстраклеточной ДНК, оказавшихся во внутриклеточном пространстве в момент репарации повреждений ДНК, и проявляющееся в виде гибели ГСК, ответственных за возобновление белого ростка кроветворения («окно смерти»). Сделано предположение, что если ОСК подобно ГСК захватывают экстраклеточные фрагменты ДНК, то можно подобрать режим, при котором будет происходить аналогичное таргетное воздействие двух препаратов на ОСК.

Подраздел 3.3 посвящен доказательству того, что опухолевые клетки, способные интернализировать экстраклеточные фрагменты дцДНК, являются опухолевыми стволовыми клетками. В двух модельных системах - карциноме Кребс-2 мыши и В-лимфоме, индуцированной вирусом Эпштейна-Барр (ВЭБ), показано наличие клеток, интернализирующих экстраклеточную дцДНК, и доказано, что указанные клетки обладают широким спектром свойств, характерных для ОСК.

Подраздел 3.4 посвящен определению механизма взаимодействия экстраклеточной ДНК с клеткой и интернализации экстраклеточной ДНК в клетки двух моделей опухолей. Показано, что первым этапом взаимодействия экстраклеточной ДНК с ОСК является электростатическое притяжение. Вторым этапом взаимодействия экстраклеточных молекул дцДНК и клетки является прочное (ковалентное) связывание с факторами клеточной оболочки, имеющими в своем составе гепарн (полианион)-связывающий домен. Третьим этапом взаимодействия дцДНК с ОСК является непосредственно интернализация внутрь клетки. Для Кребс-2 TAMRA-дцДНК зонд проникает во внутриклеточные компартменты кавеоларным механизмом эндоцитоза или макропиноцитозом. В случае В-лимфомы дцДНК зонд может интернализироваться как кавеоларным, так и клатрин-зависимым механизмом, и также макропиноцитозом.

Из результатов анализа механизма связывания и интернализации экстраклеточного дцДНК зонда в клетки следует, что в мембране белки клеточной оболочки должны быть фиксированные, несущие в своей структуре положительно заряженный домен, конкурентно связывающий гепарин и дцДНК, или консенсусную последовательность связывания дцДНК, аналогичного сайту C1q комплемента. Проведен анализ факторов, характеризующих молекулярный портрет ОСК. На основании полученных данных проведен биоинформационный (анализ результатов RNAseq) и литературный функциональный анализ факторов, отвечающих характеристикам, необходимым для возможности участия в интернализации экстраклеточной ДНК в клетку. Данные

информационной поисковой работы показали, что белки, удовлетворяющие отмеченным характеристикам, относятся к трем функциональным группам факторов клеточной оболочки. Это протеогликаны (PGs) или кавеола-ассоциированные гликопротеины (GPs), скавенджер-рецепторы (SRs) и гликозилфосфатидилинозитол-заякоренные белки (GPI-Aps).

Эти результаты описывают новую биологическую особенность ОСК. Стволовая опухолевая клетка имеет особенный ландшафт клеточной поверхности – доминирующее присутствие на цитоплазматической мембране поверхностных белков, представленных тремя группами, объединенными общей функцией, а именно: PGs/GPs, SRs и GPI-APs. И, таким образом, на поверхности ОСК одновременно собраны в один функциональный агломерат три функциональные группы. Такая особенность позволяет объединить различные уникальные свойства, присущие различным типам клеток, в одной ОСК. При этом положительный заряд оболочки ОСК является их биологической особенностью, которая реализуется в первичной ассоциации фрагментов дцДНК с положительно заряженной оболочкой.

На основании полученных результатов сформулирована концепция нового принципа детекции стволовых клеток различного генеза, включая ОСК, с использованием дцДНК маркера. Основным свойством таких клеток, позволяющим маркировать их и дифференцировать в массе коммитированных опухолевых клеток, будет общий положительный заряд и присутствие на поверхности этих клеток специфических сайтов связывания дцДНК, а меченый дцДНК зонд представляет собой универсальный инструмент для *in vitro* и *in vivo* детекции ОСК.

В подразделе 3.5 подробно описана обобщенная схема терапевтического режима «Каранахан», а в Приложении 4 к этому подразделу приводится последовательность осмысления принципов и механизмов нового терапевтического режима. В частности, описаны этапы разработки терапевтического режима (или режима воздействия) для лечения злокачественных новообразований, названного «Каранахан», а также принципы работы этого режима, основанной на хронометрическом малодозовом воздействии кросслинквирующим цитостатиком с добавлением препарата на основе дцДНК в определённые временные промежутки после воздействия цитостатика, зависящие от продолжительности репаративного цикла конкретных опухолевых клеток.

В подразделе 3.6 суммированы пошаговые этапы анализа опухолевых клеток, на основе которых разрабатывалась схема введения кросслинквирующего цитостатика и препарата ДНК-микс

Подраздел 3.7 посвящён апробации технологии «Каранахан» на моделях опухолей мыши - Кребс-2 в асцитном и солидном вариантах, гепатокарцинома Г-29, устойчивая к действию ЦФ лимфосаркома RLS, карцинома Льюиса, а также на культуре глиобластомы U87 человека. Предложенная схема введения препаратов позволила вылечить от скоротечных не излечимых экспериментальных раков до 86% мышей.

Все представленные в диссертации результаты проиллюстрированы многочисленными рисунками и таблицами.

В Главе 4 «Обсуждение» произведено сравнение собственных результатов с мировыми литературными данными. Подробно обсуждено новое свойство ОСК, имеющее общебиологическое значение и связанное со способностью ОСК интернализировать фрагменты экстраклеточной дцДНК естественным природным механизмом.

Кроме этого, обсуждается воздействие экстраклеточных фрагментов дцДНК на ОСК, возможный механизм интерференция процесса репарации межцепочечной сшивки экстраклеточными фрагментами дцДНК, интернализованными во внутриклеточное пространство ОСК.

Также подробно обсуждаются базовые отличия принципов таргетного воздействия на ОСК, используемых в терапевтическом режиме «Каранахан», от принципов, применяемых в известных противоопухолевых терапиях и место «Каранахан» в подходах к лечению злокачественных новообразований, основанных на таргетном воздействии на ОСК.

Обсуждение полученных результатов позволило автору удачно обобщить результаты проведённого исследования.

В «Заключении» описывается разработанный режим воздействия на опухолевые клетки «Каранахан» как главный итог проделанной работы, экспериментально доказавшей новые ранее не известные свойства ОСК, а также раскрывшей механизмы, влияющие на протекание репаративных процессов в ОСК. Уникальной особенностью терапии «Каранахан» является сочетание разрушения проопухолевой активности опухолевого микроокружения и опухоль-реактивную активацию клеток врожденного и адаптивного иммунитета. Уникальность терапевтического протокола технологии «Каранахан» состоит в том, что при его применении, во-первых, происходит эрадикация ОСК, в результате чего опухоль лишается туморогенного начала, во-вторых, инициируется всеохватывающий лизис коммитированных клеток, и, в-третьих, происходит активация противовопухолевого иммунного ответа. Важной характеристикой технологии «Каранахан» является возможность ее применения к любому типу опухолей, содержащих ОСК, независимо от иммуногенности опухоли и иммунного статуса организма.

Выводы полностью отражают суть проведённого исследования и соответствуют поставленным цели и задачам диссертационного исследования, а также положениям, выносимым на защиту.

Автореферат в полной мере отражает основные результаты диссертации.

Достоверность и обоснованность полученных результатов, научных положений, результатов и выводов

Достоверность результатов и выводов не вызывает сомнений и обеспечена применением в ходе исследования комплекса современных методов исследования и статистической обработки.

По результатам диссертационной работы Долговой Е.В. в соавторстве опубликованы 6 патентов, 42 статьи, из которых 41 входит в базы данных Web of Science и/или Scopus.

Результаты диссертации доложены и обсуждены на научных мероприятиях международного, всероссийского и регионального уровней.

Опубликованные работы отражают основные результаты диссертации.

Диссертационное исследование Евгении Владимировны выполнено на высоком теоретическом, методическом и экспериментальном уровнях., хорошо продуман дизайн работы, несомненно получены новые научные данные.

Диссертационная работа не вызывает вопросов и замечаний по способу изложения и содержанию, так как замечания, касающиеся описания целей, задач, положений для защиты, главы «Методы», структуры некоторых разделов, стиля изложения результатов, были учтены автором на этапе предварительного знакомства с текстом диссертации.

Вопросами дискуссионного характера могут быть:

1. Вопрос о проблеме трансляции экспериментального лечения онкологических заболеваний с животных на людей. Апробации технологии «Каранахан» у экспериментальных животных на моделях различных опухолей показала возможность остановки опухолевой прогрессии. С какими ограничениями (например, токсичность и побочные эффекты) может столкнуться трансляция технологии «Каранахан» в клиническую практику?
2. Вопрос про системы доставки препарата дцДНК.в опухоль у человека. Проводились ли (или планируются) исследования таргетной доставки препарата, применимой для клинической практики

Заключение.

Следует отметить, что диссертационное исследование Долговой Е.В. заслуживает высокой оценки. По своей актуальности, научной новизне и практической значимости, объёму и глубине проведённых исследований, достоверности полученных результатов и полноте изложения результатов в диссертации и опубликованных работах диссертационная работа Долговой Е.В. является законченной самостоятельной научно-квалификационной работой, проведённой на высоком научно-методологическом уровне, в которой решена актуальная научная проблема - формирование новой идеологии в лечении злокачественных опухолей, основанной на скоординированном по времени действию инновационных препаратов нуклеиновых кислот и кросслинквирующих цитостатиков.

Работа Долговой Е.В. «Интернализация двуцепочечной ДНК низкодифференцированными клетками млекопитающих и использование этого свойства при лечении экспериментальных опухолей», является цельным законченным научным исследованием, которое содержит новые теоретические положения и оригинальное решение проблемы создания эффективной терапевтической стратегии, избирательно уничтожающей опухолевые стволовые клетки, что полностью соответствует требованиям п.9 «Положение о присуждении ученых степеней», утверждённого постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24.09.2013 г. (в редакции с последующими изменениями) предъявляемым к докторским диссертациям. На этом основании считаю, что Долгова Е.В. может представить работу с учётом сделанных замечаний в Диссертационный учёный совет для защиты на соискание учёной степени доктора биологических наук по специальности 1.5.22 – клеточная биология

Руководитель лаборатории биохимии
чужеродных соединений

НИИ Молекулярной Биологии и Биофизики ФИЦ ФТМ,
доктор биологических наук,
профессор



А.Ю. Гришанова

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины»

630060, Россия, г. Новосибирск, ул Тимакова, 2

Адрес официального сайта <http://frcftm.ru/>

Email: aiugrishanova@frcftm.ru

