

«Утверждаю»

**Директор ФГБУ «Российский научный
центр радиологии и хирургических
технологий им. ак. А.М. Гранова»**

**Министерства здравоохранения
Российской Федерации, д.м.н.**

Д. Н. Майстренко



ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертационную работу Кутовой Ольги Михайловны «Роль межклеточных контактов в формировании резистентности опухолевых сфероидов к терапевтическим воздействиям», представленной к защите в диссертационный совет Д 24.2.340.06 при Национальном исследовательском Нижегородском государственном университете им. Н.И. Лобачевского на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2 – биофизика.

Актуальность темы диссертации

Активное развитие лекарственной терапии опухолей во второй половине 20-го века привело к созданию широкого спектра противоопухолевых препаратов и обеспечило разработку эффективных методов контроля онкологических заболеваний. В то же время, накопление клинических данных привело к пониманию существования ограничений дальнейшего развития специфической противоопухолевой терапии, ключевым из которых на сегодняшний день считается формирование лекарственной устойчивости. Высокая практическая значимость обуславливает несомненную высокую актуальность исследований в данной области. Несмотря на открытие ряда механизмов формирования устойчивости, включая гиперфункцию ABC-транспортеров, активацию ферментов внутриклеточного катаболизма лекарств и систем репарации, ингибирование путей запуска апоптоза и так далее, до настоящего времени отсутствует единая картина

молекулярных процессов, участвующих в приобретении опухолевыми клетками устойчивого фенотипа.

Таким образом, диссертационная работа Кутовой О.М., посвященная изучению механизмов формирования лекарственной устойчивости опухоли с участием межклеточных контактов, является, несомненно, актуальной, а ее результаты имеют фундаментальное и практическое значение.

Научная новизна

Выполненное исследование обладает существенной научной новизной. В рамках исследования получены и охарактеризованы опухолевые сфероиды, представляющие собой трехмерные модели аденокарциномы яичника *in vitro*. С их использованием установлено, что глубина проникновения высокомолекулярных терапевтических агентов существенно затруднена по сравнению с низкомолекулярными и не превышает 70 мкм.

Диссертантом впервые проведен комплексный анализ профиля представленности на клетках аденокарциномы яичника белков всех типов межклеточных контактов. Ключевым результатом является установление снижения совокупной представленности белков межклеточных контактов при переходе от двумерного к трехмерному культивированию.

Диссертантом также впервые экспериментально подтверждено наличие сходства и, в то же время, принципиальных отличий в профиле представленности белков межклеточных контактов, интегринов и виментина в опухолевых сфероидах и экспериментальных ксенографтных опухолях, полученных на животных.

Практическая значимость

Понимание молекулярно-клеточных механизмов, ответственных за формирование устойчивости опухолевой клетки, развиваемое в диссертационной работе, дает возможность целенаправленно управлять этим процессом и, таким, образом, достигать наибольшей терапевтической эффективности при лечении опухолей. Установление важности роли межклеточных белковых контактов позволяет рассматривать их как потенциальную мишень при разработке методов таргетного прецизионного воздействия на опухоли. При этом такие методы могут

использоваться, с одной стороны, для повышения эффективности лечения в комбинации с другими методами, а с другой, использоваться как инструмент предотвращения развития устойчивости опухолей.

Показанное в работе относительное сходство сфероидов и экспериментальных опухолей на животных предоставляет доказательную базу для использования соответствующих моделей опухолевого роста *in vitro* при исследовании канцерогенеза и доклиническом тестировании средств и методов терапии опухолей.

Соответствие представленной работы специальности

Диссертационная работа Кутовой Ольги Михайловны «Роль межклеточных контактов в формировании резистентности опухолевых сфероидов к терапевтическим воздействиям» соответствует научной специальности 1.5.2 – биофизика, в том числе областям исследования «Биофизика мембранных процессов. Рецепторы» и «Медицинская биофизика».

Публикации

Теоретические и экспериментальные результаты, полученные при выполнении диссертационного исследования, отражены в 24 печатных работах, в том числе в семи научных статьях в изданиях, индексируемых WoS и/или Scopus.

Содержание опубликованных работ полностью отражает основные положения диссертации.

Анализ содержания диссертации

Диссертационная работа построена по традиционному плану и состоит из списка сокращений, введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитированной литературы, включающего 338 ссылок. Работа изложена на 142 страницах, содержит 21 рисунок и 1 таблицу.

Во введении автором убедительно обоснована актуальность проблемы, которой посвящена диссертационная работа.

В обзоре литературы обобщены и проанализированы представленные в научной литературе данные о структуре и функциях клеточных контактов с акцентом на их роль в формировании опухолевого микроокружения и фенотипа опухолевых клеток. Проведенный теоретический анализ обозначает основные пробелы в современных представлениях, а также подчеркивает вопросы, в отношении которых имеются противоречивые точки зрения. Проведенный анализ позволил диссертанту обоснованно сформулировать цель и задачи диссертационного исследования.

Используемые в работе методические подходы адекватны поставленным задачам исследования. Детальное описание протоколов исследований и использованных материалов позволяет воспроизвести все проведенные эксперименты. Несомненным достоинством работы является использование современных высокотехнологичных методов исследования, позволяющих в совокупности говорить о надежности результатов и обоснованности сделанных выводов.

Глава «Результаты и их обсуждение» включает шесть подразделов, в которых изложены полученные диссертантом экспериментальные данные, приведено объяснение их взаимосвязи, сформулированы и обоснованы ответы на поставленные задачи диссертационного исследования. Показаны особенности морфологии и скорости роста опухолевых сфероидов, полученных диссертантом из клеток линий аденокарциномы яичника человека, подобраны оптимальные условия культивирования. Определены количественные показатели токсичности низкомолекулярного (доксорубицина) и высокомолекулярного (белкового таргетного токсина DARPIn-LoPE) агентов в отношении монослойной культуры и опухолевых сфероидов. Продемонстрировано появление устойчивости к исследуемым агентам при переходе к трехмерной модели. Диссертантом показано, что в случае белкового токсина устойчивость частично определяется его ограниченным проникновением в глубину сфероида. В то же время, другой проанализированный фактор, а именно изменение представленности целевого рецептора HER2, по-видимому, не является причиной устойчивости. Наиболее интересные результаты представлены в пятом подразделе. Показано, что на фоне отсутствия белка адгезивных контактов E-кадгерина и низкой представленности

десмоглеина-2 в используемых клеточных линиях, формирование сфероидов сопровождается существенным снижением представленности белка щелевых контактов коннексина-43 и белков плотных контактов окклюдина и ZO-1. В совокупности, уменьшение количества белков межклеточной адгезии является признаком эпителиально-мезенхимального перехода. Диссертант рассматривает этот факт для формулировки предположения о приобретении клетками более агрессивного устойчивого фенотипа. В заключительном разделе приведены экспериментальные доказательства того, что сфероиды довольно хорошо воспроизводят уровень представленности белков межклеточных контактов по сравнению с опухолями, формируемыми на иммунодефицитных животных при подкожной или интраперитонеальной перевивке. При этом подчеркивается факт наличия существенных отличий между моделями опухолевого роста по ряду других фенотипических показателей.

Интерпретация полученных экспериментальных результатов проведена в главе «Заключение». Достоинством этого раздела работы является обсуждение собственных данных с учетом опубликованных в научной литературе сведений о сигнальных путях, задействованных в реализации эпителиально-мезенхимального перехода и формировании связанной с ним устойчивости, а также сопоставление результатов, полученных разными научными группами.

Выводы диссертационной работы соответствуют поставленным цели и задачам, корректны, адекватны полученным результатам и не вызывают сомнений. Материалы диссертационной работы опубликованы и апробированы на ряде конференций.

Содержание автореферата полностью отражает основные положения диссертации.

Значимость для науки и практики полученных соискателем результатов

Выполненные диссертантом исследования имеют важное фундаментальное и прикладное значения. Важным результатом с точки зрения фундаментальной науки является расширение представлений о механизмах, регулирующих кооперацию

клеток в пределах ткани, и их нарушениям, приводящим, в том числе, к развитию опухолей и формированию устойчивого фенотипа опухолевых клеток.

Последний аспект имеет в перспективе прикладное значение, поскольку полученные знания могут быть применены при разработке новых терапевтических агентов и методов лечения онкологических заболеваний.

Также результаты рассматриваемой работы могут быть использованы в учебном процессе в высших учебных заведениях при подготовке студентов, обучающихся по биологическим и медицинским специальностям.

Вопросы и замечания по диссертации

В качестве замечаний необходимо отметить следующее:

1. В обзоре литературы по диссертационной работе практически не уделено внимания иным механизмам лекарственной устойчивости опухолей за исключением опосредованных межклеточными контактами. Это необходимо было сделать для того, чтобы понять значимость рассматриваемых диссертантом процессов и возможную взаимосвязь с другими путями формирования устойчивости.
2. Отсутствуют пояснения, к какому виду лекарственной устойчивости, врожденной или приобретенной, относится исследуемый диссертантом механизм. Работа, безусловно, выиграла бы от более четкого изложения данного аспекта.
3. В разделе 3.2 приведены сведения о высоком соответствии данных при оценке цитотоксичности на сфероидов микротитрационным методом МТТ и путем расчета объема сфероида по его линейным размерам. Не понятно, в связи с чем диссертант в дальнейшем отказался от использования МТТ. Так как в работе проводится сравнение эффекта противоопухолевых агентов в отношении монослоя и сфероидов, использование одного и того же метода представляется более оправданным.
4. Использование параметрических методов статистики и коэффициентов корреляции Пирсона требует проверки полученных данных на нормальность распределения. Результаты такой проверки в работе отсутствуют.

5. Диссертантом не приведено объяснения повышения объема сфероидов при действии низких концентраций белкового токсина (рисунок 9 в диссертационной работе). Поскольку этот эффект в монослойной культуре не наблюдается, было бы интересно узнать мнение диссертанта о возможной связи с рассматриваемыми в работе механизмами.
6. Для анализа динамики проникновения агентов в сфероид целесообразно было бы привести зависимости глубины проникновения от времени инкубации (раздел 3.3). Форма представления данных в диссертации в виде рядов изображений крайне малоинформативна.
7. В работе имеются незначительные опечатки (например, с. 84. «агрессивность опухолевых клеток и приобретением ими устойчивости»), стилистические (с. 34 «Сигнализация... может способствовать миграции за счет поддержания нахождения интегрина- β 1 на мембране клетки за счет активации работы ГТФазы») и синтаксические ошибки (с. 14 автореферата «Было показано что белок...»).

Высказанные выше замечания не носят принципиального характера и не снижают научной значимости работы.

Заключение

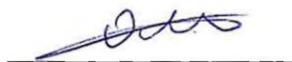
Диссертационная работа Кутовой Ольги Михайловны «Роль межклеточных контактов в формировании резистентности опухолевых сфероидов к терапевтическим воздействиям», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2 – биофизика, является законченной научно-квалификационной работой, выполненной на высоком методическом уровне и представляющей результаты, обладающей несомненной научной новизной.

По своей актуальности, объему проведенных экспериментальных исследований и значимости полученных результатов диссертация полностью соответствует требованиям «Положения о порядке присуждения ученых степеней» (Постановление Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года № 842), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата

наук, а сам автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2 – биофизика.

Диссертация и отзыв обсуждены и одобрены на проблемной комиссии по фундаментальным дисциплинам ФГБУ «РНИЦРХТ им. ак. А.М. Гранова» Минздрава России (протокол № 4/22 от 13 июля 2022 года).

Руководитель отдела
фундаментальных исследований,
главный научный сотрудник
группы молекулярно-
биологического прогнозирования
и индивидуализации лечения,
доктор медицинских наук



Молчанов
Олег Евгеньевич

«15» сентября 2022 г.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий имени академика А.М. Гранова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Почтовый адрес: 197758, Санкт-Петербург, поселок Песочный, ул. Ленинградская, д. 70

Телефон: +7 (812) 596-84-62

e-mail: info@rrcrst.ru

*Подпись руки д.м.н. О.Е. Молчанова заверено.
Генеральный секретарь ФГБУ
«РНИЦРХТ им. ак. А.М. Гранова»
Минздрава России
д.м.н. О.А. Бралик*

