

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук

Маргулиса Бориса Александровича

на диссертационную работу Шендер Виктории Олеговны «Использование омиксных технологий для изучения особенностей коммуникации между клетками злокачественных опухолей», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – «Биоорганическая химия»

Актуальность темы выполненной работы

Диссертационная работа В.О. Шендер посвящена анализу белков и РНК, которые вносят значимый вклад в формирование резистентности опухоли к противоопухолевой химиотерапии. Проблема приобретения устойчивости к действию огромного числа препаратов хорошо известна, и с ней связана недостаточно высокая эффективность применяемых в онкологии средств и, соответственно, потребность в новых видах терапии. Поскольку уровень онкологических заболеваний, особенно таких, как глиобластома, рак легких, рак желудка, яичника и других достоверно не снижается, актуальность работы В.О. Шендер сомнений не вызывает, а тот факт, что в настоящее время у специалистов нет уверенности в том, какие механизмы в раковой клетке повышают ее устойчивость, только увеличивает практическое значение работы. Автор убедительно демонстрирует и не только на основании данных корреляции, что приобретенная в ходе химиотерапии устойчивость может передаваться через механизмы межклеточных коммуникаций, причем объектом передачи являются белки и РНК сплайсосомы. В указании этой мишени заключается принципиально важное значение и актуальность диссертационной работы В.О. Шендер.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 142 страницах, содержит 52 рисунка, 9 таблиц и 222 ссылки. Диссертация построена по классическому принципу и включает следующие разделы: «Термины и сокращения», «Введение», «Обзор литературы», «Экспериментальная часть», «Результаты и их обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Список литературы» и «Приложение».

Обзор литературы включает в себя описание существующих представлений о межклеточной коммуникации клеток злокачественных опухолей и о ее вкладе в процесс возникновения устойчивости клеток к химиопрепаратам. Автор детально описывает известные способы коммуникации опухолевых клеток со своим микроокружением, дает подробное представление о каждом классе секретируемых молекул: белки, метаболиты, РНК. Важно отметить, что автором отмечаются лакуны в данных других исследователей, что

помогает понять значение диссертационной работы в быстро растущей области науки о микроокружении опухоли. Особенно интересными кажутся данные о механизмах секреции биомолекул раковыми клетками и роли жирных кислот в данном процессе. Безусловно, обзор весьма краток, но автору удалось собрать и обсудить работы последних 5-10 лет, и продемонстрировать успехи в воссоздании модели межклеточных коммуникаций в опухолевых структурах.

Раздел «**Экспериментальная часть**» детально описывает методы, использованные при выполнении диссертации. Эта часть работы дает представление о высоком методическом уровне поставленных экспериментов, в которых сочетаются современные омиксные технологии с методами классической молекулярной биологии. Список методов, как мне кажется, крайне велик для диссертационной работы, а автор, владеющий этими методами и применяющий их даже при наличии коллег-помощников, вызывает уважение. Важно, что существующие методы омиксного анализа асцитов были значительно улучшены, что сделало возможным выявление специфических РНК-связывающих белков и некодирующих РНК и липидных компонентов, что также следует отнести к методологическим успехам автора.

Научная новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Основные результаты диссертационной работы можно разделить на три части. Во-первых, проведен детальный анализ асцитных жидкостей больных раком яичника до и после химиотерапии (цисплатин); большое достоинство этой работы состоит в том, что авторы проанализировали асциты неопухолевого происхождения, которые стали контрольными образцами. Существенным выводом этой части работы стало обнаружение в асците от больных, прошедших терапию, ограниченного числа белков, состав которых отличается от контрольных, и часть этих белков относится к компонентам сплайсосом; в параллельных исследованиях в асцитах были выявлены мяРНК. Интересно, что доля хемокинов, цитокинов и факторов роста в асцитах у больных после химиотерапии снижается. Выявление мигрирующих во внеклеточном пространстве элементов сплайсосом стало открытием, за которым последовало изучение возможной функции данных белков и РНК в приобретенной устойчивости раковых клеток к цисплатину. Во второй элегантно выполненной части экспериментов автор доказывает значимость белков сплайсосом для передачи устойчивого к терапии фенотипа; эти опыты были проведены на первичных культурах клеток от больных и на трансформированных клетках, обработанных цисплатином. В обоих случаях химиотерапия или ее имитация *in vitro* приводила к появлению в межклеточном пространстве одинаковых белков и, что важно, к повышению устойчивости клеток к

терапии. Таким образом, постулируется, что белки и РНК сплайсосом должны участвовать в передаче агрессивного опухолевого фенотипа клетками, подвергнутыми химиотерапии. Ранее были идентифицированы сотни молекул, участвующих в подобной передаче и не только от одной раковой клетки к другой; хорошо известно, что такие клетки, как макрофаги и фибробласты, также подвергаются фенотипическому преобразованию, и поэтому данные, полученные В.О. Шендер с соавторами можно экстраполировать на многие клетки опухолевой ниши.

К третьей части я отношу опыты, поставленные с целью показать, что отдельные сплайсосомные компоненты участвуют в межклеточном переносе признака устойчивости к цисплатину; эта задача была также успешно решена с использованием методов трансфекции клеток. Суммируя сказанное, автор с применением высокоразрешающих, инновационных технологий доказал «избранность» компонентов сплайсосом в формировании устойчивости опухолевых клеток к химиотерапии; данные и выводы работы безусловно являются новыми и могут послужить для разработки средств преодоления указанной протекции. Выводы, представленные в конце диссертации, убедительно отражают основные достижения работы.

Теоретическая и практическая значимость

Безусловной заслугой автора является огромный труд по сбору материала от пациентов, координации работы по омиксному анализу, по впечатляющим экспериментам на клетках и по объединению всех данных в одно целое. Даже в случае, если с В.О. Шендер работала большая группа коллег, вклад диссертанта значителен. Достаточно изучить толкование полученных данных по анализу белков секретомов раковых клеток (стр. 81-98) или продуманность экспериментов с компонентами сплайсосом РНК U12 и Ubatas. Анализируя работу целиком, можно утверждать ее фундаментальное звучание, то есть заряженность на решение очень крупных задач, понимание того, что является промотором создания устойчивого опухолевого фенотипа. С другой стороны, в работе используются клинические образцы, и тот факт, что основа резистентности в клетках от онкологических пациентов и в трансформированных практически одинакова, позволяет говорить о высоком практическом значении диссертации.

Замечания к диссертации

Замечаний к работе В.О. Шендер у меня практически нет. Хочется пожелать автору кроме методики МТТ для оценки реакции клеток на цисплатин измерить еще и количество умерших клеток с помощью окраски Трипановым синим, уровень апоптоза и, возможно, определить темпы реального роста клеточной популяции с использованием технологий xCELLigence. Советую применить проточную цитометрию, и тогда на основании данных такого, более подробного анализа можно было бы сказать о том, что действительно

происходит с модельной клеточной популяцией и насколько реальны глобальные изменения, спровоцированные изменениями в аппарате сплайсинга.

--В автореферате на стр. 12 представлены данные интересного опыта по инкубации первичных клеток рака яичника в асцитных жидкостях больных, после ХТ и без нее (рис.11); при этом клетки вновь обрабатывают цисплатином; для чего и где результаты такой обработки; в диссертации таких данных я не нашел.

--Автор почему-то считает, что опыты, проводимые с первичными клетками рака яичника не относятся к категории *in vitro*, тогда как с клетками SKOV3 уже точно относятся; в чем же тогда дело и к какой категории автор отнесет первые?

--Встречаются очень неудачные фразы, например, на стр. 77 такая «Что касается сплайсосомных белков, ранее среди опубликованных работ нигде не было показано, что сплайсосомные белки могут быть экспортированы...»

--Выражение «терапевтический стресс» и тем более химиотерапевтический стресс используется автором во всей диссертации, хотя понятие «стресс» мне кажется относящимся более к физиологии.

--Надо бы избегать выражений типа «Общие белки, дифференциально повышенные в представленности после ХТ (автореферат, с 15).

Изложенные выше замечания несут рекомендательный характер, не являются указанием на принципиальные ошибки и не подвергают сомнению адекватность использованных методов и надежность полученных результатов. Работа представляется новой, интересной, проведенной на высоком теоретическом и методическом уровне, опирающейся на очень солидную методическую базу.

Общее впечатление о диссертационной работе

Работа В.О. Шендер представляет собой многогранное исследование, выстроенное на ультрасовременных омиксных технологиях, и хочется пожелать автору дальнейшего внедрения в более практическую область, которая представляет собой создание «правильных» мишеней (некоторые уже обозначены), белков или РНК, и разработку таргетных средств для терапии высокоустойчивых опухолей человека.

Автореферат

Автореферат полностью соответствует содержанию диссертации, результаты которой отражены в 5 статьях в научных российских и международных журналах, входящих в перечень изданий, рекомендованных Минобрнауки РФ для опубликования результатов диссертации, а также в тезисах докладов и материалах 12 научных конференций.

Заключение

По актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости работа полностью соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям «Положением о присуждении ученых степеней» (утверждено постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. №842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. №335; 02.08.2016 г. №748; 29.05.2017 г. № 650), а ее автор, Шендер Виктория Олеговна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – «Биоорганическая химия».

Главный научный сотрудник
лаборатории защитных механизмов клетки
Федерального государственного бюджетного
учреждения науки Институт цитологии
Российской академии наук (ИНЦ РАН)
доктор биологических наук



Маргулис Б.А.

Контактная информация:

Адрес: 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий проспект, д. 4
Тел.: +7(812)297-37-94; e-mail: margulis@incras.ru

Подпись д.б.н. Маргулиса Б.А.
«Удостоверяю»

Ученый секретарь
кандидат биологических наук
«*И.И. Тюряева*» 2018 г.



Тюряева И.И.