

## **ОТЗЫВ официального оппонента**

**доктора биологических наук Уласова Ильи Валентиновича на  
диссертационную работу Рябой Оксаны Олеговны на тему «Влияние  
автофагии на механизмы роста, прогрессии и химиорезистентности  
меланомы кожи человека», представленную на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук по специальности 14.01.12 – Онкология**

### **Актуальность темы исследования**

Исследованию роли автофагии в прогрессии и резистентности опухолей к терапии посвящено значительное количество работ за последнее десятилетие . Аутофагия представляет собой эволюционно сложившийся катаболический путь, который позволяет опухолевым клеткам выживать при нехватке питательных веществ, энергии или в условиях гипоксии. В последнее время активно изучается взаимосвязь автофагии и эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП). Различные исследования подчеркивают ключевую роль автофагии в модуляции подвижности опухолевых клеток и инвазии, лекарственной устойчивости и иммунологическом надзоре, определяющие метастатический успех раковых клеток. С одной стороны, активация автофагии обеспечивает энергию и основные питательные вещества для ЭМП во время распространения метастазов, что помогает клеткам выживать в неблагоприятных условиях окружающей среды. С другой стороны, автофагия, выступающая в качестве функции, подавляющей опухолевый рост, склонна препятствовать метастазированию путем избирательного подавления критических факторов транскрипции эпителиально-мезенхимального перехода на ранних стадиях. Следовательно, воздействие на эпителиально-мезенхимальный переход ингибиторами или активаторами автофагии может быть новой стратегией, которая позволит предположить новые мишени для противоопухолевой терапии.

Следует отметить, что ингибитор автофагии хлорокин и его производное гидроксихлорокин проходят клинические испытания как в монорежиме в адьюванте, так и в комбинации с противоопухолевыми препаратами при ряде

злокачественных новообразований (колоректальный рак, рак почки, рак головы и шеи, глиобластома).

Диссертация Рябой О.О. посвящена исследованию роли аутофагии в резистентности и прогрессии меланомы кожи. В работе изучено действие как отдельно ингибиторов процесса, так и их комбинации с темозоломидом на пролиферативные способности клеток меланомы. Таким образом, актуальность темы не вызывает сомнений, так как меланома является опухолью с высокой устойчивостью к существующей терапии, включая таргетную терапию и иммунотерапию, а также она отличается ранним метастазированием.

### **Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, их достоверность и новизна**

Обоснованность научных положений и выводов диссертации Рябой О.О. обусловлена достаточным объемом исследований, обширной методической базой, включающей в себя современные молекулярно-биологические и генетические исследования, широкий спектр использованных в работе клеточных линий *in vitro*, а также статистической обработкой данных. Работу отличает продуманность в выборе моделей и методов исследования, адекватных для решения поставленных задач, что подтверждает достоверность полученных результатов. Достоверность выводов подтверждена результатами экспериментальных исследований, выводы аргументированы в тексте диссертации.

Научная новизна исследования состоит в том, что на основании изученной корреляции между наличием мутаций в гене *BRAF* и уровнем аутофагии в клетках меланомы показана разница в химиотрезистентности и прогрессии этих линий. Впервые показана роль GRP78 в ответе клеток меланомы на цитотоксическое действие темозоломида у линий с разным уровнем базальной аутофагии. Впервые изучена ко-экспрессия транскрипционных факторов и белков эпителиально-мезенхимального перехода ZEB1, SNAIL, TWIST, E- и N-cadherin, Vimentin, и др. с экспрессией белков аутофагии. Показано изменение уровня экспрессии данных

белков под действием ингибиторов аутофагии LY-294.002 и хлорокина. В диссертации представлено влияние ингибиторов аутофагии на инвазию и миграцию клеток меланомы под действием ингибиторов аутофагии, а также комбинации темозоломида с LY-294.002 или хлорокином в зависимости от уровня аутофагии в опухолевых клетках и статуса гена *BRAF*.

### **Оценка содержания диссертационной работы**

Диссертация написана в традиционном стиле и изложена на 138 страницах, содержит 24 рисунка и 7 таблиц. Список литературы состоит из актуальных статей, в основном представлен зарубежным источниками.

**Во введении** автор четко формулирует цель и задачи исследования, подчеркивает важность настоящего исследования для разработки новых подходов к лечению меланомы кожи.

**Глава I. Обзор литературы** посвящена анализу данных по механизмам клеточной гибели, молекулярным механизмам процесса аутофагии, роли аутофагии в канцерогенезе, прогрессии опухоли и т.д. Обзор охватывает большой спектр современной литературы, позволяет критически проанализировать современное состояние обсуждаемого вопроса.

**Глава II. Материалы и методы** указывает на высокую методическую подготовленность автора; в работе использован большой спектр современных лабораторных методов: иммуноблоттинг, проточная цитометрия, определение антипролиферативной активности, колониеобразования, трансфекция клеточных линий, определение активирующих мутаций в гене *BRAF*, ПЦР с обратной транскрипцией и др. Статистический анализ проведен с помощью программ Microsoft Excel и GraphPad Prizm, что подчеркивает достоверность полученных результатов.

**Глава III. Результаты собственных исследований** включает несколько подглав. В первой приведены данные по исследованию влияния мутации *BRAFV600* на базальный уровень аутофагии в клеточных линиях меланомы человека. На основании полученных данных все изученные клеточные линии

разделены на те, что имеют высокий, и те, что имеют уровень аутофагии. автор показывает, что изменения уровня белка аутофагии Beclin 1 при старвации отличалось в различных линиях меланом и, по-видимому, было связано геном с BRAF , так в клетках BRAFwt эти условия приводили к увеличению экспрессии Beclin 1 в 2-5 раз, в то время как в BRAFv600 клетках он практически не менялся.

Основное внимание в работе уделено влиянию ингибиторов аутофагии на действие темозоломида. Темозоломид один из эффективных алкилирующих противоопухолевых агентов, который применяется орально и способен проникать через гипоталамо-гипофизарный барьер достигать резистентных к терапии клеток меланомы, включая метастатических. Несмотря на чувствительность опухолевых клеток к ТМЗ, в клинических испытаниях на пациентах с метастатической меланомой, терапия ТМЗ не показала существенного прироста в выживаемости пациентов. Таким образом, идет поиск эффективной терапевтической комбинации ТМЗ с другими противоопухолевыми агентами. Так как один из механизм действия противоопухолевого препарата такого как ТМЗ включает индукцию клеточной аутофагии, то было целесобранно исследовать возможность модуляции аутофагии в присутствии темозоломида.

В качестве ингибиторов использовался хлорокин и LY-294.002. Использование этих агентов в различных комбинациях показало наличие усиленного антитромиферативного эффекта во всех исследованных линиях. Далее автор изучил, влияет ли статус BRAF на данную комбинированную терапию, и оказалось, что корреляции между наличием активирующих мутаций BRAF и повышением цитотоксичности не было выявлено экспериментально.

В следующем подразделе изучалось влияние комбинированной терапии с ингибиторами аутофагии на клеточный цикл, индукцию апоптотической гибели клеток меланомы человека под действием темозоломида в комбинации с модуляторами аутофагии. показано, что при обработке клеток меланомы ингибиторами аутофагии CQ и LY-294.002 цитотоксический эффект усиливался, но также имелось отличие в чувствительности различных клеточных линий. Как

показано автором, наличие активирующих мутаций в гене *BRAF* не оказало существенного влияния на чувствительность к комбинированному воздействию.

Для уточнения механизма аддитивной цитотоксичности использованных препаратов трансфецировали исследуемые клетки с помощью малых интерферирующих (ми)РНК к GRP78. Несколько ранних исследований продемонстрировали индукцию GRP78 в опухолевых клетках, включая клетки меланомы. Более того, Vurrel et al, 2008 отметил, что TMZ стимулирует образование GRP78 в клетках-мишениях, что приводит их к резистентности. Таким образом, чтобы изучить влияние GRP78 на терапию клеток меланомы хлорокином в присутствии TMZ, соискателем был проведен ряд функциональных тестов, включая MTT и тест на инвазию. Показано, что в отношении ряда линий полученные данные несколько разнились, например, количество колоний в клеточной линии Mel Z уменьшилось на 30% при воздействии темозоломида, а при его комбинации с CQ на ~ 60% по сравнению с контролем. Далее автор определял цитотоксический эффект темозоломида на клеточные линии меланом с нокдауном GRP78 методом MTT. Полученные данные указывают, что нокдаун усиливает цитотоксическое действие темозоломида в клетках с высоким базальным уровнем аутофагии, но не в клетках с низким и средним уровнем аутофагии.

Особого внимания заслуживают данные по эффективности подавления инвазии клеток меланомы при комбинации TMZ и ингибиторов аутофагии. Автором показано, что частично эффективность комбинации может быть связана со снижением маркеров эпителиально-мезенхимального перехода N-кадгерина и β-катенина, а также с ролью Beclin 1 и других ингибиторов аутофагии.

**В главе «Обсуждение»** автор довольно подробно анализирует полученные данные, сравнивая их с литературными данными. Подчеркивая значимость проведенного исследования для использования ингибиторов аутофагии, как в терапии злокачественной меланомы, так и в оценке возможной опухолевой прогрессии.

Автореферат диссертации отражает основные положения диссертации. Результаты полностью отражены в 9 научных статьях, опубликованных в российских и иностранных изданиях, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России.

### **Замечания**

Диссертационная работа подготовлена с высокой тщательностью, однако стоит обратить внимание на наличие нескольких недочетов, никак не умаляющих общую высокую оценку работы. А именно: большинство выделенных клеточных линий меланомы, используемых в работе, прошли около 30 пассажей. Несмотря на значительное количество пассажей, установленные линии сохранили свои свойства, но хотелось бы увидеть поведение свежевыделенных клеток меланомы и их ответ на действие ТМЗ в присутствии индукторов аутофагии. Второе, в некоторых экспериментах, желательно иметь негативные контроли. Например, на Рисунке 1, базальный уровень Беклин 1 в фибробластах кожи позволил бы сравнить уровень экспрессии в здоровых и опухолевых клетках. Также, подписи к рисункам, хотелось бы видеть более развернутыми с объяснениями различий экспрессии по цветовой гамме и по отношению к экспрессии референсного белка (актина). На рисунках 3-5 приведены диаграммы поведения клеток в присутствии темзоломида и модуляторв аутофагии. Было бы удобнее воспринимать данные, если бы на изображениях были показаны статистические различия между группами, а также если бы автор выбрал обозначение осей координат на русском языке на данных диаграммах, и эти обозначения были унифицированы по всему тексту.

### **Заключение**

Диссертация Рябой Оксаны Олеговны «Влияние аутофагии на механизмы роста, прогрессии и химиорезистентности меланомы кожи человека» является оригинальным законченным научно-квалификационным исследованием, в котором решена актуальная задача онкологии по исследованию роли аутофагии в резистентности клеток меланомы к противоопухолевой терапии. По своей

новизне, теоретической и практической значимости диссертация соответствует требованиям «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24 сентября 2013 г. (в редакции постановлений Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 г. № 335, от 02 августа 2016 г. № 748, от 29 мая 2017 г. № 650, от 28 августа 2017 г. № 1024 и от 01 октября 2018 г. № 1168), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.01.12 – Онкология.

Официальный оппонент:

Заведующий группой экспериментальной биотерапии и диагностики

Института регенеративной медицины

ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России

(Сеченовский университет)

Доктор биологических наук

(14.01.12 – Онкология)

Уласов Илья Валентинович

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский университет),  
119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 8  
8 (495) 609-14-00  
rektorat@mma.ru

