

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ФГБУ «РНЦРР»

Минздрава России

академик РАН, д.м.н., профессор

В.А. Солодкий

«14» октября 2020 г.



ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

федерального государственного бюджетного учреждения «Российский научный центр рентгенорадиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации о научно-практической значимости диссертационной работы Рябой Оксаны Олеговны «Влияние аутофагии 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 диссертации

Диссертация Рябой О.О. посвящена актуальной теме фундаментальной и прикладной онкологии по изучению химиорезистентности и опухолевой прогрессии меланомы кожи.

Аутофагия является эволюционно сложившимся катаболическим путем лизосомальной утилизации белков и органелл для поддержания своего гомеостаза и жизнедеятельности. Аутофагия может использоваться опухолевыми клетками для выживать при нехватке питательных веществ, энергии или гипоксии, предотвращая накопление токсинов внутри клетки. Наоборот, aberrантная аутофагия может привести к неконтролируемой деградации белков и органелл, которые необходимы для поддержания выживаемости опухолевых клеток, что в конечном итоге приводит к гибели опухолевых клеток. Меланома, как и большинство злокачественных опухолей, является гетерогенной опухолью, что связано с таким феноменом, как генетическая нестабильность, приводящему к различным генетическим нарушениям. Так в 50-70% случаев меланомы кожи встречаются мутации в гене BRAF.

Считается, что активирующие мутации в гене BRAF влияют на способность меланомных клеток к аутофагии: наличие BRAF-мутации обуславливает повышенный уровень базальной аутофагии в клетках опухоли.

Более того, ряд противоопухолевых препаратов, включая и таргетную терапию, активирует процесс аутофагии, что приводит к развитию резистентности к существующей терапии, в том числе нацеленной на сигнальные пути МАРК и PI3K/mTOR. Таким образом, ингибирование аутофагии может помочь преодолеть химиорезистентность меланомы к терапии. В последние годы несколько клинических испытаний, сочетающих противоопухолевые препараты с ингибиторами аутофагии при разных типах злокачественных образований, показали, что инактивация аутофагии вызывает уменьшение роста опухоли и увеличивает сроки выживаемости пациентов.

Аутофагия может по разному влиять на выживаемость опухолевых клеток, как способствовать опухолевому росту, так и подавлять его, что зависит от типа клеток и тканей. Различные исследования подчеркивают ключевую роль аутофагии в модуляции подвижности опухолевых клеток и инвазии, лекарственной устойчивости и иммунологическом надзоре, определяющие метастатический успех раковых клеток. Эпителиально-мезенхимальный переход - сложный процесс трансдифференцировки клеток, при котором клетки теряют свои адгезивные свойства и приобретают мезенхимальные. Кроме того, опухолевые клетки секрецируют повышенное количество матрикс-деградирующих протеаз для разрушения внеклеточного матрикса и облегчения миграции клеток. Вышеупомянутые маркеры связаны с лекарственной устойчивостью к таким препаратам, как гемцитабин, 5-фторурацил, цисплатин и адриамицин.

Сигнальные пути, связанные с эпителиально-мезенхимальным переходом, оказывают влияние на аутофагию. В свою очередь, активация аутофагии может подавлять или способствовать эпителиально-мезенхимальному переходу, регулируя различные сигнальные пути. Следовательно, воздействие на эпителиально-мезенхимальный переход ингибиторами или активаторами аутофагии может быть новой стратегией, которая позволит предположить новые мишени для противоопухолевой терапии.

Таким образом, актуальность полученных результатов о возможности ингибиторов аутофагии потенцировать действие темозоломида как на клетках

меланомы с диким типом гена *BRAF*, так и с его мутантным вариантом, и влияние ингибирования аутофагии на опухоловую прогрессию и маркеры мезенхимальности не вызывает сомнений.

Связь с планами соответствующих отраслей науки

Тема диссертации Рябой О.О. «Влияние аутофагии на механизмы роста, прогрессии и химиорезистентности меланомы кожи человека» выполнялась в соответствии с планом научно-исследовательской работ ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, а также соответствует задачам федерального проекта «Борьба с онкологическими заболеваниями» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Новизна полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Целью данного исследования являлось исследование влияния процесса аутофагии на резистентность клеточных линий меланомы к темозоломиду, а также возможность регуляции роста и прогрессии клеток меланомы за счет ингибирования аутофагии *in vitro*. Данные эксперименты были проведены на клеточных линиях меланомы кожи человека как с разным мутационным статусом гена *BRAF*, так и с разным уровнем аутофагии в клетках.

Для решения поставленных задач автором был разработан оригинальный дизайн исследования. Изначально в исследование было включено 14 клеточных линий меланомы, полученных от пациентов, проходивших лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии Н.Н. Блохина» Минздрава России, а также 2 линии из АТСС каталога, что делает полученные результаты высоко репрезентативными. Впервые представлена взаимосвязь между базальным уровнем аутофагии и наличием мутаций в гене *BRAF* в клетках меланомы человека. Впервые изучена роль аутофагии в ответе клеток меланомы на противоопухоловую терапию в зависимости базального уровня аутофагии и мутационного статуса гена *BRAF*. Автором показана потенциальная эффективность режимов терапии с использованием ингибиторов аутофагии хлорокина и LY-294.002 и темозоломида, представлены данные об их взаимодействии на молекулярном уровне. Автор

также оценил влияние белка GRP78 на ответ клеточных линий к темозоломиду. Показано, что интактивация данного белка потенцирует цитотоксичность темозоломида.

Автором представлены результаты по мониторингу маркеров аутофагии не только по изучению экспрессии ее белков, но также за счет использования флюоресцентных меток, позволяющих в реальном времени исследовать процесс аутофагии.

Новизна исследования состоит в комплексном изучении взаимодействия белков эпителиально-мезенхимального перехода и аутофагии в клеточных линиях. Впервые изучены ко-экспрессия транскрипционных факторов эпителиально-мезенхимального перехода ZEB1, TWIST, SNAIL и маркеров аутофагии Beclin 1, LC3B и p62, а также изменение их экспрессии этих маркеров под действием ингибиторов аутофагии хлорокина и LY-294.002 и применяемого лекарственного лечения. Показано влияние ингибиторов аутофагии на способность клеток меланомы к инвазии и способности к формированию колоний.

В целом, результаты диссертации расширяют представления о биологии меланомы, позволяют выявить новые потенциальные мишени и разработать новые подходы для борьбы с этим заболеванием.

Достоверность выводов и результатов исследования

Работа выполнена на достаточном экспериментальном материале. Использованный в исследовании спектр молекулярно-биологических методов и модели адекватны поставленным задачам. Выводы логически вытекают из полученных результатов и достаточно обоснованы собственными и литературными данными. Достоверность представленных данных подтверждается наличием статистической обработки данных в программе GraphPad Prizm v.5.0. результаты проведенного исследования используются в практике лаборатории биомаркеров и механизмов опухолевого ангиогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Значимость для науки и производства полученных автором диссертации

результатов

Работа является первым в России научным трудом, направленным на изучение значимости процесса аутофагии в росте, прогрессии и резистентности меланомы к противоопухолевой терапии. Представленные экспериментальные данные получены на большом материале, отличающемся по своим молекулярно-генетическим характеристикам. Эффективность инактивации аутофагии в ответе на терапию темозоломидом показана как для клеток с диким типом BRAF, так и с его мутантными вариантами. Таким образом, данная комбинация может быть перспективной для дальнейшего изучения.

Представленные данные о перекрестном функционировании аутофагии и эпителиально-мезенхимального перехода и возможности регулирования этих двух процессов посредством ингибиторов аутофагии на примере исследования клеточных линий меланомы позволит найти клинически значимые биомаркеры для предсказания опухолевой прогрессии и, возможно, новые мишени для противоопухолевой терапии

Конкретные рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

Результаты диссертационной работы могут быть использованы коллективами и лабораториями научно-исследовательских институтов, национальных исследовательских центров и вузов, занимающихся изучением биологии опухолевой клетки, а также созданием и тестированием новых противоопухолевых препаратов.

Заключение

Диссертационная работа Рябой Оксаны Олеговны «Влияние аутофагии на механизмы роста, прогрессии и химиорезистентности меланомы кожи человека» является законченным научно-квалификационным исследованием, выполненным на современном методическом уровне. Работа содержит решение актуальной задачи фундаментальной онкологии по изучению механизмов резистентности опухолевых клеток к существующей противоопухолевой терапии. По своей

научной 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.

Отзыв обсужден на научной конференции научно-исследовательского отдела молекулярной биологии и экспериментальной терапии опухолей федерального государственного бюджетного учреждения «Российский научный центр рентгенорадиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации Протокол №2 от «12» февраля 2020 г.

Заведующий научно-исследовательским отделом
молекулярной биологии и экспериментальной терапии опухолей
ФГБУ «РНЦРР» Минздрава России
д.м.н., профессор

Боженко В.К.

Подпись д.м.н., профессора Боженко В.К. «ЗАВЕРЯЮ»



Ученый секретарь
ФГБУ «РНЦРР» Минздрава России
д.м.н., профессор

Цаллагова З.С.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научный центр рентгенорадиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.
117997, Москва, ул. Профсоюзная, д.86.
тел.: 8(495)333-41-80
www.rncrr.ru, e-mail: mailbox@rncrr.rssi.ru;