

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

ведущего научного сотрудника отделения экспериментальной фармакологии и токсикологии Московского научно-исследовательского онкологического института имени П.А.Герцена – филиала Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, доктора биологических наук Елены Романовны Немцовой на диссертационную работу Анастасии Андреевны Калининой

«ГЕМОПОЭТИЧЕСКИЕ, ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЕ И ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ СВОЙСТВА РЕКОМБИНАНТНОГО ЦИКЛОФИЛИНА А ЧЕЛОВЕКА», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.01.12 – онкология

Актуальность избранной темы

Диссертационная работа А.А. Калининой «Гемопоэтические, иммуномодулирующие и противоопухолевые свойства рекомбинантного циклофилина А человека» посвящена изучению различных биологических свойств рекомбинантного циклофилина А человека (рчЦфА). Актуальность темы исследования обусловлена, с одной стороны, многообразием физиологических функций нативного ЦфА в организме человека, а с другой стороны, неоднозначностью его влияния на системы организма при различных процессах, воздействиях и состояниях организма, по данным литературы.

Поскольку ранее было показано, что ЦфА является одним из участников хемотаксиса гемопоэтических стволовых клеток, предположили, что этот белок будет способствовать восстановлению гемопоэза и иммунной системы организма после миелосупрессивных воздействий, в частности, после лучевой и химиотерапии у больных злокачественными заболеваниями. При этом его роль в развитии и прогрессии опухолевых процессов также была неясна из имеющихся научных публикаций. Соответственно, поиск ответов на вопросы об истинной биологической роли ЦфА человека является актуальным для оценки возможности

использовать биотехнологический (рекомбинантный) ЦфА человека в качестве лекарственного средства поддерживающей терапии в онкологии.

**Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций,
сформулированных в диссертации**

Достоинством диссертационного исследования, несомненно, является использование разнообразных методических подходов и экспериментальных моделей при его выполнении. Разносторонний подход к изучению иммунного ответа на воздействия (оценка субпопуляционного состава клеток иммунокомпетентных органов и тканей, гуморального и клеточного ответа у животных и в системе *in vitro* в реакциях бласттрансформации и смешанной культуры лимфоцитов), изучение противоопухолевого действия рчЦфА на различных перевиваемых опухолях у животных индивидуально и в сочетании с консервативными методами лечения (лучевой и химиотерапией), использование ПЦР в реальном времени для оценки экспрессии генов в тканях первичной опухоли у животных, иммуногистохимического анализа ангиогенеза в опухоли, создание трансгенной модели для изучения рчЦфА как фактора микроокружения гемопоэтических стволовых клеток, - все это не позволяет усомниться в получении результатов, доказанных многочисленными грамотно спланированными экспериментами.

Отмеченная при создании трансгенной модели (мышей с индуцируемой экспрессией ЦфА в остеобластах) эмбриотоксичность высоких доз ЦфА изучена в специальных экспериментах, результаты которых подтвердили тератогенное действие рчЦфА, проявляющееся в развитии анатомических пороков развития плода при введении белка в период органогенеза.

Научные положения и выводы логично вытекают из результатов, полученных путем адекватной статистической обработки данных экспериментальных исследований.

Практические рекомендации направлены на дальнейшие исследования с использованием оригинальной модели трансгенных животных, разработанной в диссертационном исследовании, а также на дальнейшее изучение молекулярных

механизмов противоопухолевого действия рчЦФА. В то же время можно рекомендовать продолжить изучение механизмов и других физиологических функций рчЦФА.

Рекомендация проведения клинических исследований является несколько преждевременной, поскольку к настоящему моменту выполнены только медико-биологические исследования оригинальной субстанции рчЦФА, но до клинических испытаний необходимо провести еще многоэтапные доклинические исследования, включающие фармацевтическую разработку, изучение фармакодинамики, фармакокинетики и безопасности лекарственного средства.

Научная новизна исследования и достоверность полученных результатов

Научная новизна исследования не вызывает сомнения. Она очевидна уже из того, что диссертант является соавтором 2-х патентов по созданию оригинальных продуцентов рекомбинантного циклофилина А человека (2013 и 2015 г.г.), продукт которых изучает в диссертационной работе, а также одного патента на изобретение противоопухолевого средства на основе продукта (2014 г.). То есть объект исследования является оригинальным, соответственно, полученные экспериментальные данные и обобщенные результаты также являются оригинальными.

Достоверность полученных результатов обеспечена тщательно спланированными экспериментальными исследованиями, которые построены очень логично, с использованием многообразных методических подходов экспериментальной онкологии и иммунологии, молекулярной генетики, выполнены с использованием разнообразных моделей, большого количества животных, различных опухолевых штаммов и культур клеток. Полученные данные проанализированы с использованием современных методов статистической обработки, принятых в биологических исследованиях.

Структура работы

Диссертация написана в традиционном стиле, изложена на 194 страницах машинописного текста, состоит из введения, 4-х глав, заключения, выводов, списка сокращений и списка литературы, в который включены 187 цитированных

источников (8 отечественных и 179 зарубежных). Работа проиллюстрирована 32 таблицами и 87 рисунками.

Во **Введении** автором обоснована актуальность темы исследования и рассмотрена степень проработанности проблемы. В обосновании приведены данные литературы и даны краткие заключения о достоинствах и недостатках используемых методов противоопухолевой иммунотерапии, тезисно указаны свойства циклофилина А человека - объекта диссертационного исследования, известные из результатов ранее проведенных работ как самого диссертанта, так и других исследователей в мире.

Из приведенных сведений логично вытекают цель и задачи диссертационной работы, которые сформулированы очень четко. На основании этих формулировок легко прослеживается ход мыслей исследователя при планировании работы, а соответственно, ясно, на какие вопросы необходимо получить ответы по ее завершении.

Теоретическая и практическая значимость исследования лаконично и корректно сформулированы.

Положения, выносимые на защиту, логично вытекают из полученных результатов.

В **Главе 1 «Обзор литературы»** подробно описана структура и функции ЦфА, локализация его в органах и тканях. Целесообразным является представление строения рецептора CD147, который играет ключевую роль в реализации хемокиновой функции ЦфА, его экспрессии в клетках и механизма взаимодействия с ЦфА.

Поскольку взаимодействие ЦфА с рецептором CD147 важно не только для осуществления хемокиновой функции, закономерно следует дальнейшее обсуждение роли ЦфА и CD147 при окислительных стрессах, которые имеют причинно-следственную связь с развитием сердечно-сосудистых заболеваний.

Справедливо отмечен бифазный характер влияния ЦфА на биологические процессы. Ключевую роль в этой двойственности ЦфА играет его концентрация: только при низких концентрациях ЦфА выступает в роли ангиогенного фактора,

стимулируя пролиферацию, миграцию и инвазию эндотелиальных клеток, но при высоких концентрациях он, напротив, индуцирует гибель эндотелиоцитов.

Полноценно освещена роль ЦфА и его рецептора CD147 в развитии онкологических процессов на основании данных современной научной литературы. Здесь также отмечено неоднозначное влияние ЦфА на прогрессию злокачественных процессов, стимуляцию ангиогенеза, развитие множественной лекарственной устойчивости.

В заключении обзора литературы сделано обобщение о том, что представленные источники данных описывают роль ЦфА только при уже развившихся процессах, из которого логично вытекает вывод о целесообразности оценки роли ЦфА на начальных стадиях патогенеза, а также роли не только внутриклеточного, но и секреторного ЦфА, что может открыть новые возможности в терапии различных заболеваний.

Обзор литературы написан хорошим языком, легко читается. Цитированная литература отражает как исторический ракурс рассмотренной тематики, так и сведения последних лет.

Замечание. Некоторым недостатком обзора литературы является его краткость. Изложение материала можно бы дополнить более глубоким обсуждением включенных работ и отношением к ним автора, что украсило бы эту главу.

Однако это замечание не является критическим и не умаляет ценность представленного материала.

В Главе 2 «Материалы и методы» подробно представлены использованные материалы, методики, различные схемы введения рчЦфА. Необходимо отметить высокий современный уровень экспериментальных исследований, грамотный выбор контрольных материалов и, соответственно, контрольных групп животных при изучении различных аспектов физиологического действия объекта исследования.

Замечание. Необходимо отметить, что в настоящее время при оценке противоопухолевого эффекта оригинальных лекарственных средств используются

следующие критерии, указанные в Руководстве по проведению доклинических исследований лекарственных средств (Часть первая / Под ред. А.Н. Миронова, Часть первая. -М.: Гриф и К, 2012. С. 643):

ТРО >70% в течение 7 дней при исследовании на 3-х моделях;

УПЖ при наличии солидных опухолей >50%

Полная ремиссия – отсутствие признаков опухоли у > 50% животных в течение 60 дней;

Излечение - отсутствие признаков опухоли у >50% животных в течение 90 дней.

В диссертационном исследовании использованы критерии из более ранней редакции Руководства по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ (ред. Р.У.Хабриев, М, «Медицина», 2005, 832 с.): ТРО >50%; УПЖ >25%, то есть более мягкие критерии эффективности.

Указанные критерии в обоих случаях рекомендованы для химических синтетических лекарственных средств. Однако, несмотря на то, что рчЦФА является представителем биологических препаратов, для которых не установлены специальные значения показателей эффективности, применение более жестких критериев оценки противоопухолевого эффекта, на наш взгляд, позволяет точнее охарактеризовать его эффективность и, соответственно, в дальнейшем точнее прогнозировать возможность применения лекарственного средства на основе рчЦФА в различных клинических ситуациях.

В Главе 3 «**Результаты исследования**» отражены результаты исследования функций рчЦФА, которые могут оказать существенное влияние на состояние различных систем организма, как у интактных животных, так и у животных после радиационного и химиотерапевтического воздействия. Главная задача этих исследований – оценить возможность применения рчЦФА в качестве средства поддерживающей терапии для коррекции состояния гомеостаза после консервативной противоопухолевой терапии.

У интактных животных показано, что курсовое введение рчЦФА не приводит к серьезным изменениям гомеостаза, не изменяет активационный фенотип Т-лимфоцитов, но индуцирует активацию В-лимфоцитарного звена периферической крови. Изучение влияния рчЦФА на кроветворение у мышей после сублетального

облучения не выявило существенных изменений в динамике состава костного мозга и периферической крови облученных животных, однако было показано, что введение рчЦФА усиливает миграцию стволовых гемопоэтических клеток в периферические органы. Это приводит к более быстрому восстановлению субпопуляционного состава клеток селезенки и тимуса.

Для химиотерапевтического воздействия был использован 5-фторурацил, который широко применяется в различных схемах химиотерапии и оказывает выраженное дозозависимое гематотоксическое действие. Важно подчеркнуть правильный выбор контроля, которым являлся липополисахарид (ЛПС) *E. Coli* в дозе, эквивалентной примесному количеству в образцах изучаемого рекомбинантного ЦФА человека. Использование такого контроля исключило вероятность ошибки при оценке индукции отмеченных изменений за счет иммуномодулирующего влияния ЛПС.

В системе *in vitro* получены данные, коррелирующие с таковыми в системе *in vivo*, свидетельствующие, что рчЦФА индуцирует активацию и пролиферацию В-лимфоцитов, но не оказывает влияния на Т-клеточное звено иммунитета в отсутствие активации Т-лимфоцитов. Однако достоверно показана комитогенная активность рчЦФА в отношении Т-лимфоцитов селезенки после их активации конканавалином А.

Подробно изучено иммуномодулирующее действие рчЦФА в отношении различных звеньев иммунитета интактных животных и животных после радиационного и химиотерапевтического воздействия.

Выявлена неоднозначная роль рчЦФА в отношении компонентов иммунитета при различных иммуносупрессивных воздействиях. При курсовом введении рчЦФА сублетально облученным животным наблюдается уменьшение антителообразующих клеток и интенсивности реакции гиперчувствительности замедленного типа, то есть, подавление гуморального и клеточного иммунного ответа. В то же время при сочетанном введении 5-ФУ и рчЦФА изучаемый белок способствует поддержанию клеточного иммунного ответа на уровне такового у интактных животных.

Из данных литературы известно, что ЦфА во многих случаях рассматривается как проонкогенный белок. Поэтому совершенно логично были проведены эксперименты по изучению влияния рчЦфА на рост и метастазирование экспериментальных опухолей различного гистогенеза. Результаты по торможению роста перевиваемых опухолей не вызывают сомнения, однако интерпретация результатов, на наш взгляд, может быть несколько иной.

Замечание. На основании полученных данных неправомерно говорить о «ярко выраженном» противоопухолевом действии рчЦфА. Отмеченные факты можно характеризовать лишь как тенденцию к противоопухолевому действию и то преимущественно для схемы введения «7 дней до и 7 дней после инокуляции опухолевого материала». Однако эта схема не имеет клинического значения, поскольку нет возможности прогнозировать, когда у человека разовьется опухоль, а соответственно, когда начинать вводить препарат. Не ясна клиническая роль «профилактического» введения рчЦфА в процессе закладки метастазов, поскольку опять-таки не известно, когда они закладываются, это не поддается прогнозированию.

Изучение механизма действия рчЦфА показало, что белок не влияет на процессы ангиогенеза, но повышает экспрессию генов MMP8, MMP9, MMP12 и тканевого ингибитора металлопротеиназ TIMP1. Здесь мы опять сталкиваемся с неоднозначностью эффектов рчЦфА. Отсутствие стимуляции ангиогенеза и влияния на экспрессию генов MMP с установленными проонкогенными свойствами, а также увеличение экспрессии гена TIMP1 под действием рчЦфА - это, конечно, положительные аспекты действия рчЦфА. Но металлопротеиназы MMP8, MMP9, MMP12, экспрессия генов которых под действием рчЦфА усиливается, все-таки, по данным большинства авторов, играют отрицательную роль в развитии злокачественных процессов, стимулируя инвазию и метастазирование. В последнее время появляются работы, противоречащие этому утверждению, однако этот вопрос еще требует углубленного изучения.

Интересными являются результаты по оценке участия рЧЦФА в противоопухолевом иммунном ответе, на основании которых можно предположить его роль в организме как одного из факторов противоопухолевой защиты. Представленные в диссертации данные являются основанием для продолжения изучения механизмов реализации этим белком своих разнообразных функций.

Серьезным заданием на будущее представляется разработка уникальной модели трансгенных мышей, которая позволяет проводить изучение роли рЧЦФА в гемопоэзе и функционировании гемопоэтической системы организма.

Глава 4 «Обсуждение результатов» имеет важное значение в работе, поскольку именно в этой главе приводятся научные положения, которые являются плодом осмысления автором полученных экспериментальных данных. Глава построена фактически так же, как предыдущая, что позволяет читателю легко сопоставить полученные результаты с объяснениями и умозаключениями, сделанными при анализе результатов.

Заключение содержит квинтэссенцию полученных новых сведений о функциональной активности в различных системах оригинального изученного объекта – рекомбинантного циклофилина А человека. Написан этот раздел работы очень ясно, лаконично и отражает глубокое понимание автором значения полученных результатов и возможные перспективы их дальнейшего использования.

Выводы полностью отражают все аспекты проведенного исследования, коррелируют с поставленными задачами и отвечают на вопросы, которые возникли при анализе данных литературы и планировании работы.

Рекомендации по использованию результатов работы

Выполнение диссертационной работы фактически было направлено на проведение медико-биологических исследований биотехнологического продукта – рекомбинантного циклофилина А человека. Экспериментальные исследования выявили ряд физиологических функций этого белка, которые могут оказаться полезными при использовании его в качестве средства поддерживающей терапии

у больных с различными иммунодефицитными состояниями. Однако в настоящее время, учитывая не вполне однозначные результаты, полученные на опухолевых моделях, выявленное эмбриотоксическое действие рчЦФА, целесообразно продолжить изучение его безопасности, механизма действия, фармакокинетики и других аспектов, необходимых для дальнейшей апробации в клинике.

Модель трансгенных животных, позволяющая изучать роль рчЦФА в гемопоэзе, является основой для продолжения исследований в этой области.

Оценка содержания и оформления диссертации

Текст диссертации написан хорошим литературным языком, легко читается, имеющиеся в небольшом количестве стилистические и синтаксические ошибки не мешают пониманию смысла. Диссертация прекрасно иллюстрирована 87 рисунками и 32 таблицами. Несмотря на то, что многие данные, приведенные в таблицах, дублируются рисунками, это не отягощает текст, а лишь помогает восприятию результатов.

Автореферат полностью отражает содержание диссертационной работы. Все аспекты исследования описаны в опубликованных научных работах – статьях в рецензируемых журналах, тезисах докладов на научных форумах различного ранга и патентах на изобретения.

Замечания, приведенные ниже, не носят принципиального характера и не умаляют достоинства работы.

1. Оглавление написано излишне подробно (представлено на 5 страницах), рубрикация достигает 5 цифр (например: 1.3.3.1.3 Фактор адаптации), но сам текст многих пунктов изложен очень коротко - на 1/3 страницы, соответственно, нецелесообразно приводить его в оглавлении, достаточно включить пункты с двузначными номерами.

2. Нет необходимости во Введении 8 раз использовать слово «впервые» при описании научной новизны исследования, поскольку она следует из оригинальности объекта исследования.

**Заключение о соответствии диссертации критериям,
установленным Положением ВАК**

Диссертационная работа Анастасии Андреевны Калининой «Гемопоэтические, иммуномодулирующие и противоопухолевые свойства рекомбинантного циклофилина А человека» является законченной научно-квалификационной работой, выполненной под руководством доктора медицинских наук, профессора Дмитрия Борисовича Казанского. Она содержит новое решение актуальной научной задачи изучения физиологической роли рекомбинантного циклофилина А человека, имеющей существенное значение для онкологии в области создания инновационных лекарственных средств биотехнологического происхождения. Диссертационная работа А.А. Калининой соответствует всем 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).

Немцова Елена Романовна,

доктор биологических наук,

ведущий научный сотрудник отделения экспериментальной
фармакологии и токсикологии

Московского научно-исследовательского онкологического института
имени П.А.Герцена – филиала ФГБУ «Национальный медицинский
исследовательский центр радиологии» Минздрава России



Подпись руки доктора биологических наук Е.Р.Немцовой заверяю.

Ученый секретарь ФГБУ «Национальный медицинский
исследовательский центр радиологии» Минздрава России

Е.П.Жарова

