

«УТВЕРЖДАЮ»

Первый заместитель генерального
директора

ФГБУ «НМИЦ радиологии»

Минздрава России

доцент, д.м.н.

А.А. Костин

« 18 »

01

2019 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Московского научно-исследовательского онкологического института имени П.А. Герцена – филиала федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации на диссертацию Никулицкого Сергея Игоревича «Изучение экспрессии и локализации рецептора VEGF-R1 в опухолевых и нормальных клетках человека», представленной на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.01.12 - Онкология.

Актуальность темы работы

Диссертационная работа Никулицкого С.И. посвящена изучению молекулярно-биологических характеристик рецептора фактора роста эндотелия сосудов 1 типа – VEGF-R1. Этот белок является представителем системы VEGF/VEGF-рецепторы, обеспечивающей формирование собственной кровеносной сети опухоли, где играет роль негативного регулятора ангиогенеза. Такая функция VEGF-R1 экспериментально доказана и обусловлена его структурными особенностями – низкой тирозинкиназной активностью, а также наличием растворимых изоформ, связывающихся с лигандом, но не способных к трансдукции сигнала.

Поскольку рецептору исходно была отведена антиангиогенная роль, в онкологии долгое время ему практически не уделяли внимания. Однако сравнительно недавно, после того как экспрессия VEGF-R1 обнаружена во

многих злокачественных клетках при отсутствии в соответствующих нормальных, взгляд на функцию рецептора лишь как на супрессор ангиогенеза изменился. Более того, в отдельных работах показано непосредственное участие VEGF-R1 в таких важных процессах, как инвазия, метастазирование и выживаемость опухолевых клеток. Появилось предположение о наличии у рецептора «неангиогенных» свойств, способствующих росту и прогрессии опухолей.

К сожалению, несмотря на первые полученные сведения о вкладе VEGF-R1 в канцерогенез, на сегодняшний день данных о его «онкологических» функциях крайне мало, а имеющиеся противоречивы. В частности, точно не определена клеточная локализация рецептора, что не позволяет установить механизм его действия и составить целостную картину функционирования VEGF-R1 в опухолевой клетке.

В связи с этим, актуально дальнейшее всестороннее изучение молекулярно-биологических характеристик рецептора: распределения VEGF-R1 по клеточным структурам, механизм активации и передачи сигнала, связи между уровнем его экспрессии и злокачественностью клетки. В будущем это даст возможность подобрать адекватные способы ингибирования активности рецептора, а также позволит оценить вероятность использования VEGF-R1 как прогностического фактора и в качестве мишени для молекулярно-направленной терапии новообразований.

Связь темы с программой научно-исследовательских работ

Тема исследования непосредственно связана с планом научно-исследовательских работ НИИ ЭДиТО ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Степень обоснованности научных положений и выводов

Работа включает в себя исследования по нескольким направлениям, объединенным общей целью и задачами. Основные положения и результаты

диссертации глубоко проанализированы. Представленный объём и качество материала являются достаточными для решения поставленных задач и обеспечивают обоснованность выводов, вытекающих из обсуждения полученных результатов. Данные работы подвергнуты тщательной обработке, что позволяет считать их вполне достоверными.

Выводы конкретно и чётко сформулированы, логично вытекают из результатов проведённых исследований и могут принести существенный вклад в повышение эффективности таргетной терапии опухолей в практической онкологии.

Научная новизна полученных результатов

Научная новизна работы состоит в том, что:

- Выявлена экспрессия гена VEGF-R1 в ранее не исследованных в этом отношении линиях опухолевых клеток человека – BRO (низкодифференцированная высокозлокачественная меланома), A431 (карцинома вульвы);

- Модифицирован протокол ИЦХ-окрашивания клеток для прицельной детекции белка в ядре. С его помощью показано присутствие VEGF-R1 в ядрах исключительно злокачественных клеток;

- Впервые проведена количественная оценка распределения рецептора по структурам (наружная мембрана, цитоплазма, ядро) нормальных и опухолевых клеток человека;

- Разработан метод экстракции нативных клеточных ядер, пригодных для анализа на проточном цитометре, что дало возможность измерить ядерное содержание VEGF-R1 в изучаемых клетках. Установлено, что наибольший уровень рецептора в ядре соответствует наиболее злокачественной клеточной линии;

- Проведён анализ распределения изоформ VEGF-R1 между ядром и цитоплазмой. Показано, что в опухолевых клетках полноразмерная изоформа рецептора выявляется исключительно в ядре и не определяется в цитоплазме, а в

нормальных клетках, наоборот, регистрируется только в цитоплазме и отсутствует в ядре.

Научно-практическая значимость работы

Выполненное исследование имеет большое теоретическое и практическое значение.

В работе описан разработанный автором метод изоляции нативных, очищенных от примесей цитоплазмы клеточных ядер, пригодных для анализа на проточном цитометре. Данная методика позволяет с высокой точностью проводить количественную оценку уровня ядерных белков, что важно как для фундаментальных исследований, так и в диагностических целях в практической медицине.

Выявленная в работе внутриклеточная (цитоплазматическая и ядерная) локализация VEGF-R1 указывает на интракринный механизм стимуляции рецептора лигандом, что необходимо учитывать при подборе оптимальных подходов к подавлению активности рецептора.

Установленный в исследовании наибольший уровень VEGF-R1 в ядрах злокачественных клеток и отсутствие рецептора в ядрах нормальных свидетельствуют о потенциальной возможности использования показателя ядерной экспрессии VEGF-R1 как предиктора неопластической трансформации. Кроме того, эти данные оправдывают выбор самого рецептора, а точнее, его полноразмерной изоформы, в качестве молекулы-кандидата для таргетной терапии новообразований.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

Полученные в диссертационной работе Никулицкого С.И. результаты представляют несомненную научно-практическую ценность и могут быть рекомендованы для использования в учреждениях, занимающихся диагностикой и таргетным лечением онкологических заболеваний.

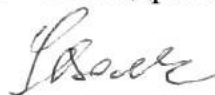
Заключение

Диссертационное исследование Никулицкого Сергея Игоревича «Изучение экспрессии и локализации рецептора VEGF-R1 в опухолевых и нормальных клетках человека» посвящена актуальной проблеме современной молекулярной онкологии – изучению экспрессии, клеточной локализации и механизмов действия рецептора фактора роста эндотелия сосудов 1 типа. Научная новизна, практическая и теоретическая ценность работы не вызывают сомнений. Полученные результаты расширяют имеющиеся фундаментальные знания о механизмах действия VEGF-R1, его функциях и роли в опухолевом росте и прогрессии, а также могут быть полезны для определения действенных методов подавления активности рецептора. В частности, сам автор предлагает перспективный генно-инженерный способ ингибирования VEGF-R1, который, возможно, в будущем сможет быть реализован в клинической практике.

Таким образом, диссертационная работа Никулицкого С.И. «Изучение экспрессии и локализации рецептора VEGF-R1 в опухолевых и нормальных клетках человека» представляет собой самостоятельное законченное научно-квалификационное исследование, выполненное на современном методическом уровне, и содержит решение актуальной научной задачи – повышения эффективности таргетной противоопухолевой терапии, – имеющей существенное значение для современной онкологии. Представленная работа отвечает всем требованиям «Положения о присуждении учёных степеней», утверждённого Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. №842 (в редакции постановления Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 г. №335 и от 2 августа 2016 г. №748), предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени кандидата наук, а её автор Никулицкий Сергей Игоревич достоин присуждения степени кандидата медицинских наук по специальности 14.01.12 – «онкология».

Отзыв на диссертационную работу С.И. Никулицкого обсужден на заседании отдела онкоморфологии МНИОИ им. П.А. Герцена – филиала ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России (протокол № 1 от «17» 01 2019 г.).

Заведующая отделом онкоморфологии
МНИОИ им. П.А. Герцена –
филиала ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России,
профессор, д.м.н.



Н.Н. Волченко

Подпись профессора, д.м.н. Волченко Н.Н. «заверяю»

Ученый секретарь
МНИОИ им. П.А. Герцена – филиала
ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России



Е.П. Жарова

Волченко Надежда Николаевна, заведующая отделом онкоморфологии МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, доктор медицинских наук, профессор
125284, Москва, 2-й Боткинский проезд, дом 3
+7 (495) 945 – 80 – 20

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора медицинских наук, профессора **Владимира Константиновича Боженко** на диссертационную работу Никулицкого С.И. **«Изучение экспрессии и локализации рецептора VEGF-R1 в опухолевых и нормальных клетках человека»**, представленную на соискание учёной степени кандидата медицинских наук по специальности 14.01.12 – «онкология»

На сегодняшний день эффективность таргетной терапии в лечении злокачественных заболеваний не вызывает сомнений. Именно поэтому интерес к исследованиям, направленным на поиск новых молекулярных мишеней, перспективных в качестве объектов для таргетных противоопухолевых препаратов, с каждым годом только растёт. В роли одной из таких потенциальных мишеней может выступать рецептор фактора роста эндотелия сосудов 1 типа (VEGF-R1), который, как показано в отдельных работах, экспрессируется на поверхности опухолевых клеток и степень его экспрессии коррелирует с степенью злокачественности опухоли. В тоже время, механизм действия и молекулярно-биологические характеристики данного рецептора в неопластической и нормальной клетке изучены недостаточно. Поэтому актуальны дальнейшие исследования VEGF-R1, которые позволят оценить возможность использования рецептора в качестве новой мишени для противоопухолевой терапии.

Поэтому работа Сергея Игоревича Никулицкого, посвященная количественному и качественному изучению содержания рецептора VEGF-R1 в опухолевых и нетрансформированных клетках, представляет собой важную и актуальную проблему, решение которой необходимо как для фундаментальной науки, так и практической онкологии.

Следует отметить несомненную **научную новизну** и теоретическую и практическую ценность диссертационного исследования С.И. Никулицкого. Автор изучал рецептор в опухолевых клетках в сравнении с нормальными, что крайне важно для понимания роли VEGF-R1 в контексте злокачественной

трансформации. В работе не только установлена клеточная локализация рецептора, но и впервые выполнена количественная оценка его распределения по компартментам клетки: на наружной мембране, в цитоплазме и ядре. Кроме того, определён вклад полноразмерной изоформы VEGF-R1 в формирование опухолевого фенотипа. Полученные результаты расширяют имеющиеся фундаментальные знания о механизмах действия рецептора, его функциях и роли в опухолевом росте и прогрессии. В работе предложен новый, оригинальный и перспективный способ подавления активности рецептора - «перепрограммирование» сплайсинга VEGF-R1 с целью увеличения выхода растворимых изоформ.

Диссертационная работа С.И. Никулицкого построена по общепринятому плану и включает следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и их обсуждение, заключение и выводы. Диссертация изложена на 100 страницах машинописного текста, содержит 28 рисунков и 7 таблиц. Список литературы включает 134 ссылки на публикации по теме исследования из которых 16 отечественных и 118 зарубежных источников. Материал диссертации проиллюстрирован 28 рисунками и 7 таблицами.

Во введении обоснованы актуальность, теоретическая новизна и практическая значимость диссертационной работы, сформулирована цель исследования – изучить экспрессию белка VEGF-R1 и его содержание в различных компартментах опухолевых и нормальных клеток человека. Для достижения поставленной цели автором сформулировано 5 логично вытекающих из современных представлений о рецепторе задач.

Обзор литературы изложен на 26 страницах. Написан хорошим научным языком и даёт исчерпывающую информацию по теме диссертации. Автор описывает роль и место VEGF – фактора роста эндотелия сосудов и его рецептора в нормальной физиологии, а также его роль в патогенезе злокачественных новообразований. Также подробно разбирается молекулярное строение VEGF-R1 и его изоформ, клеточная локализация и предполагаемые механизмы действия VEGF-R1. В заключении к данному разделу кратко

изложена суть нерешенных проблем, явившихся предметом проведенного исследования. Приведенная в обзоре литературы информация позволила автору сформулировать актуальные цель и задачи работы.

Глава **«Материалы и методы»** содержит подробное описание объектов и методов исследования для изучения экспрессии, локализации и содержания VEGF-R1. Исследование проведено на 4-х линиях опухолевых клеток человека различного гистогенеза и 2-х линиях нормальных клеток. Для определения уровня экспрессии гена в клетках использовали два подхода. Один основывался на оценке уровня мРНК, для чего применяли полуколичественный ПЦР (с использованием электрофореза, как метода оценки эффективности ПЦР) и количественный qPCR, в варианте неспецифической окраски конечных продуктов с SYBR Green I. Определялись количества двух вариантов сплайсинга мРНК гена VEGF-R1. В качестве референсных генов использовались GAPDH и hHPRT1. Вторым методом регистрации количества и локализации VEGF-R1 был метод иммуноцитохимии и проточной цитометрии. Особого внимания заслуживает тот факт, что для решения ряда исследовательских задач были разработаны новые, ранее не описанные методологические подходы. Это модификация протокола иммуноцитохимии с целью прицельной регистрации ядерных белков и метод экстракции чистой фракции интактных клеточных ядер для их дальнейшего анализа на проточном цитометре.

Применяемые в работе самые современные методические приёмы, безусловно, свидетельствуют о высоком научно-методическом уровне автора.

Глава **«Результаты и их обсуждение»** включает параграфы, объединяющие результаты исследования, произведенные с привлечением комплекса использованных методов. Приводятся результаты анализа экспрессии гена VEGF-R1 в различных клеточных линиях. Автором установлена локализация белка рецептора, измерено содержание VEGF-R1 в различных клеточных отсеках опухолевых и нормальных клеток человека, определено соотношение изоформ рецептора и их распределение между ядром и цитоплазмой.

Автор убедительно доказывает, что для опухолевых клеточных линий человека характерна именно ядерная локализация рецептора. Важно, что в исследовании результаты, полученные одним методом, как правило, подтверждаются и при использовании других методик. Таким образом, достоверность выявленных различий не подлежит сомнению, а представленные новые данные расширяют имеющиеся фундаментальные знания о механизмах действия VEGF-R1, его возможной роли в опухолевом росте и прогрессии, что может быть использовано в практическом плане при диагностике и, в перспективе, для таргетной терапии онкологических заболеваний.

В **Заключении** автор обобщает результаты и обсуждает их прикладное значение. Особо стоит отметить этот раздел в плане логической интерпретации полученных в исследовании данных, их соотнесения с имеющимися литературными сведениями и собственными рассуждениями. Кроме того, заслуживает внимания предложенный автором способ подавления активности VEGF-R1, который потенциально позволит добиться как антиангиогенного, так и непосредственно противоопухолевого терапевтического эффекта.

Выводы вполне соответствуют поставленным в работе цели и задачам и методам, использованным в работе. В качестве объектов исследованы 4 линии опухолевых клеток человека различного гистогенеза и степени злокачественности: A431 (рак наружных женских половых органов), Sn12c (светлоклеточная карцинома почки), A549 (немелкоклеточный рак лёгкого), BRO (высокозлокачественная меланома кожи). Контрольными линиями нормальных клеток служили ПФЧ (теломеризованные постнатальные фибробласты человека) и H1036 (нормальные человеческие фибробласты).

Автореферат адекватно отражает содержание диссертации.


Автором опубликовано 7 печатных работ в изданиях входящих в список ВАК.

Оценивая диссертацию **Сергея Игоревича Никулицкого «Изучение экспрессии и локализации рецептора VEGF-R1 в опухолевых и нормальных**

клетках человека» в целом, можно заключить, что она является научно-квалифицированной работой, в которой получены новые фундаментальные данные, представляющие несомненную практическую значимость для диагностики и лечения онкологических заболеваний, а именно, для разработки таргетных препаратов, воздействующих на рецептор VEGF-R1.

Таким образом, актуальность проблемы диссертационной работы С.И. Никулицкого, значительный объём исследований, их современный и высокий методологический и технический уровень, принципиальная новизна и высокая научно-практическая значимость соответствуют всем требованиям «Положения о присуждении учёных степеней», утверждённого Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. №842 (в редакции постановлений Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 г. №335 и от 2 августа 2016 г. №748), предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени кандидата наук, а её автор Никулицкий Сергей Игоревич достоин присуждения степени кандидата медицинских наук по специальности 14.01.12 – «онкология».

Официальный оппонент,
заведующий научно-исследовательским отделом
молекулярной биологии и
экспериментальной терапии опухолей
ФГБУ «РНЦРР» МЗ РФ,
доктор медицинских наук,
профессор
Место работы: 117997, г. Москва,
ул. Профсоюзная, д. 86.
Телефон: +7(903)7996484.
E-mail: vbojenko@mail.ru

 **Боженко В.К.**
22.01.2018

Подпись д.м.н., профессора Боженко В.К. «заверяю»:
Учёный секретарь
ФГБУ «РНЦРР» Минздрава России,
доктор медицинских наук, профессор



Цаллагова З.С.

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора медицинских наук, доцента Титова Константина Сергеевича на диссертационную работу Никулицкого Сергея Игоревича «Изучение экспрессии и локализации рецептора VEGF-R1 в опухолевых и нормальных клетках человека», представленную на соискание учёной степени кандидата медицинских наук по специальности 14.01.12 – онкология.

Актуальность исследования

Роль исследований, целью которых является прояснения функций белков, вовлеченных в передачу регуляторных сигналов от поверхности клетки до ядра, возросла в связи с активной разработкой и внедрением в клиническую практику противоопухолевых таргетных препаратов, мишенью которых является патогенетически значимый белок или сигнальный каскад. На этом пути предстоит обнаружить ещё много неожиданных, порой даже парадоксальных, открытий, которые позволят не только избавиться от устоявшихся стереотипов, мешающих развитию научного познания, но и откроют новые направления для разработки противоопухолевых лекарственных средств. Результаты, полученные С.И. Никулицким при выполнении им диссертационного исследования, весьма многообещающи именно благодаря тому, что они с неожиданной стороны освещают, казалось бы, глубоко изученный механизм взаимоотношений в системе лигандов и рецепторов регуляторного каскада VEGF/VEGF-рецепторы. Со времени своего открытия рецептор фактора роста эндотелия сосудов 1 типа – VEGF-R1 – долгое время рассматривали лишь в качестве негативного регулятора ангиогенеза, который в период внутриутробного развития призван сдерживать избыточное формирование кровеносных сосудов плода, а у взрослых в норме играет очень ограниченную

роль. Однако в последнее время появились данные о том, что в опухолевых клетках VEGF-R1 способен выполнять ряд функций, напрямую не связанных с ангиогенезом. Например, экспрессия рецептора сопровождалась повышением выживаемости неопластических клеток, а также усилением фенотипических проявлений их злокачественности (миграция, инвазия, метастазирование). Эти «неангиогенные» эффекты VEGF-R1 отмечены для самых разных типов опухолевых, но не нормальных, клеток, что само по себе может указывать на участие рецептора в процессах малигнизации. Несмотря на эти вновь открывшиеся факты, заставляющие по-иному взглянуть на биологическую роль VEGF-R1 при злокачественном росте, работ по этой тематике крайне мало, а имеющиеся очень фрагментарны. Каждая группа исследователей изучала какой-то один из аспектов: конкретное биологическое свойство, промежуточные звенья сигнальных каскадов, экспрессию VEGF-R1 в клетках только определённого гистогенеза и т. д. Такие разрозненные данные пока не позволяют установить механизм действия рецептора и составить более или менее целостную картину его функционирования. Более того, на сегодняшний день точно не определена даже клеточная локализация VEGF-R1, что помогло бы прояснить вышеупомянутые вопросы.

Таким образом, необходимость дальнейшего целенаправленного изучения молекулярно-биологических характеристик рецептора продиктована не только фундаментальным интересом, но и потенциальной значимостью для практической онкологии. Ведь ограниченная роль VEGF-R1 во взрослом организме означает, что подавление активности рецептора представляет собой вполне выполнимую терапевтическую задачу.

Научная новизна работы

В представленной работе её автором, Никулицким С.И., впервые проведена количественная оценка распределения рецептора и его изоформ по компартаментам нормальных и опухолевых клеток человека. Используя 2 методических подхода, автор установил, что полноразмерная форма VEGF-R1

присутствует в ядрах исключительно неопластических клеток. Эти результаты, во-первых, свидетельствуют о том, что именно данная изоформа рецептора может вносить вклад в процесс злокачественного перерождения, и, во-вторых, указывают на потенциальную возможность использования уровня ядерной экспрессии полноразмерного VEGF-R1 в качестве маркера опухолевой трансформации.

Внимания заслуживает и разработанный С.И. Никулицким метод изоляции интактных клеточных ядер для их последующего анализа на проточном цитометре. По сравнению с уже существующими методиками ядерной экстракции этот метод даёт возможность выделять нативные, хорошо очищенные от примесей цитоплазмы клеточные ядра, что позволяет получать точные количественные данные об уровне искомого протеина.

Оформление диссертации

Диссертационная работа С.И. Никулицкого оформлена по традиционному плану и включает в себя все необходимые разделы, состоит из введения, глав обзора литературы, материалов и методов, собственных результатов и обсуждения, а также включает выводы, список сокращений и перечень цитированных автором литературных источников. Текст изложен хорошим литературным языком, логичен и содержит необходимую доказательную базу, лежащую в основе сделанных автором выводов. Диссертация изложена на 100 страницах, проиллюстрирована 28 рисунками и 7 таблицами. В работе приводятся ссылки на 134 литературных источника, 118 из которых составляют зарубежные работы.

Во введении автор кратко описывает тему исследования, аргументирует её актуальность, новизну и научно-практическую значимость, формулирует цель диссертационной работы – изучение экспрессии VEGF-R1 и содержания этого белка в различных компартментах опухолевых и нормальных клеток человека. Для достижения поставленной автором поставлено 5 задач, включая разработку нового метода изоляции клеточных ядер для оценки содержания в

них рецептора.

Глава «Обзор литературы» состоит из 2 подразделов и заключения, объединяющих 7 рубрик. В этой главе автор даёт общую характеристику факторам VEGF и их рецепторам, подробно описывает их молекулярную структуру и предполагаемые механизмы действия VEGF-R1 в норме и при онкопатологии. Автор приводит последние литературные данные по обсуждаемым вопросам и обосновывает необходимость дальнейшего исследования экспрессии белка VEGF-R1 в опухолевых и нормальных клетках для прояснения роли рецептора в канцерогенезе.

В главе «Материалы и методы исследования» автор использовал большое число современных высокотехнологичных и зачастую трудоёмких методик: ОТ-ПЦР, ПЦР в режиме реального времени, ИЦХ, цитофлуориметрический анализ клеток и ядер, Вестерн-блоттинг и др., – что показывает его высокую квалификацию в качестве исследователя-экспериментатора. Для доказательства ядерной локализации VEGF-R1 в опухолевых клетках автор применил 2 оригинальных, ранее нигде не описанных метода: модифицированный протокол ИЦХ с целью прицельной детекции ядерных белков, а также методику проточной цитометрии для измерения уровня протеинов в нативных клеточных ядрах, упоминание о которой справедливо вынесено в отдельный вывод, завершающий диссертацию.

В главе «Результаты собственных исследований и в обсуждении» представлен анализ экспрессии и локализации VEGF-R1 проводился на разных клеточных моделях с использованием разнообразных молекулярно-биологических методов. В связи с этим, объединение полученных результатов с их обсуждением представляется вполне логичным. Данная глава содержит 3 подраздела, объединяющие 10 рубрик. В первом описаны особенности экспрессии гена VEGF-R1 в неопластических клетках, выявленные с помощью полуколичественной ПЦР и ПЦР в режиме реального времени. Второй подраздел посвящен идентификации и измерению содержания белка рецептора

в опухолевых и нормальных клетках человека. Показано, что уровень VEGF-R1 на поверхности и неопластических, и нормальных клеток крайне низок и статистически не различается в обоих случаях. А внутриклеточное содержание рецептора в опухолевых клетках исследованных линий оказалось примерно в 3 раза выше, чем в контрольных нормальных фибробластах.

Самым ярким результатом работы С.И. Никулицкого, на мой взгляд, является обнаружение нового феномена – выяснилось, что в злокачественных клетках онкогенный потенциал рецептора VEGF-R1 проявляется совсем не в том клеточном компартменте, как ожидалось из стереотипных представлений. Оказалось, что в опухолевых клетках рецептор расположен преимущественно в ядре. Ядерная локализация VEGF-R1 в злокачественных клетках свидетельствует об интракринном механизме стимуляции рецептора. Это важное наблюдение открывает новые возможности для поиска способов противоопухолевой терапии и требует пересмотра сложившихся взглядов о работе системы VEGF/VEGF-R. В третьем подразделе с помощью Вестерн-блоттинга автор проанализировал белковые лизаты, полученные из ядер и цитоплазмы изучаемых клеток. Выяснилось, что растворимая изоформа VEGF-R1 присутствует и в цитоплазматической, и в ядерной фракциях как опухолевых, так и нормальных клеток. В то же время мембранно-связанная форма рецептора в опухолевых клетках выявлялась только в ядрах, а в нормальных – исключительно в цитоплазме. Исходя из этого, оценку уровня ядерного VEGF-R1 Никулицкий С.И. предлагает рассматривать в качестве перспективного прогностического маркёра прогрессии опухоли.

Выводы вполне соответствуют поставленным целям и задачам и корректно отражают полученные результаты исследования. Материалы, изложенные в диссертации, отражены в виде 7 публикаций в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК РФ.

Заключение

Таким образом, диссертационная работа Никулицкого Сергея Игоревича «Изучение экспрессии и локализации рецептора VEGF-R1 в опухолевых и нормальных клетках человека» является законченной научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненного автором анализа осуществлено решение актуальной научной задачи современной онкологии. По актуальности проблемы, достаточному объему исследования, современному методологическому и техническому уровню, новизне результатов и их высокой научно-практической значимости работа соответствует п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней» №842 от 24 сентября 2013 года (в редакции постановления Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 года №335 и от 2 августа 2016 года №748), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.01.12 – онкология.

Заведующий онкохирургическим
отделением опухолей кожи и
мягких тканей ГБУЗ МКНЦ
им. А.С. Логинова ДЗМ, д.м.н., доцент



Титов К.С.

28.01.2019

Подпись д.м.н., доцента Титова К.С. «ЗАВЕРЯЮ».

Ученый секретарь
ГБУЗ МКНЦ
имени А.С. Логинова ДЗМ, к.м.н.



Косачева Т.А.

Адрес: 111123, г. Москва, шоссе Энтузиастов, 86.

Тел. 8(495) 304-30-39. ks-titov@mail.ru

ОТЗЫВ

доктора медицинских наук И.Е. Трубицыной Заведующей лаборатории доклинических исследований ГБУЗ «МКНЦ имени А.С. Логинова» ДЗ г. Москва на автореферат диссертационной работы Никулицкого С.И. «Изучение экспрессии и локализации рецептора VEGF-R1 в опухолевых и нормальных клетках человека», представленной на соискание учёной степени кандидата медицинских наук по специальности 14.01.12 – «онкология»

Актуальность работы. Диссертация Никулицкого С.И. «Изучение экспрессии и локализации рецептора VEGF-R1 в опухолевых и нормальных клетках человека», посвящена одной актуальных проблем в онкологии изучению механизмов подавления ангиогенеза, что может помочь в создании противоопухолевых препаратов.

Новизна исследования полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. В настоящее время определение локализации и механизмов экспрессии рецептора VEGF-R1 в опухолевых и нормальных клетках человека остается актуальной проблемой, которая позволит определить взаимодействие, биологически активных соединений VEGF/рецептор1 с VEGF в прогрессии неопластических процессов.

Значимость для науки и производства полученных автором диссертации результатов. Представленная работа Никулицкого С.И. актуальна для современной онкологии. Автора заинтересовали «нестандартные» свойства одного из ключевых регуляторов ангиогенеза – рецептора фактора роста эндотелия сосудов 1 типа – VEGF-R1. В литературе имеются немногочисленные исследования, которые продемонстрировали, что он экспрессируется в опухолевых клетках различного гистогенеза и принимает участие в их росте и прогрессировании. У взрослых физиологическая роль рецептора ограничена, что даёт возможность рассматривать его в качестве потенциальной мишени для таргетной терапии. Целью работы явилось выяснение локализации, молекулярных механизмов действия и функций VEGF-R1 в опухолевых и нормальных клетках человека.

Оценка содержания диссертации. Обоснование степени достоверности полученных данных и выводов диссертации. Диссертация изложена в традиционном стиле, представлена на 100 страницах компьютерного текста и проиллюстрированы 28 рисунками и 7 таблицами. Состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, главы результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений и литературы. Представленная работа имеет высокую научно-практическую ценность. Благодаря исследованиям, которые провел диссертант установлена точная клеточная локализация VEGF-R1, измерено его содержание в различных структурах опухолевых и нормальных клеток человека, проанализировано распределение изоформ рецептора между ядром и цитоплазмой. Эти данные расширяют имеющиеся фундаментальные знания о сложноорганизованной системе VEGF/VEGF-R в целом и конкретно о малоизученном рецепторе VEGF-R1, его функциях и участии в опухолевом росте и прогрессии. Кроме того, они могут быть полезны в практическом плане для диагностики и прогнозирования течения онкологических заболеваний. Исследования проведены на достаточном материале, который проанализирован и статистически обработан. Диссертантом блестяще написанная глава «Заключение», в которой сопоставлены полученные в своей работе данные с уже имеющимися

литературными сведениями. Он очертил круг нерешённых проблем и перспектив для будущих исследований. Автореферат полностью отображает диссертационную работу С.И. Никулицкого. Выводы, сделанные автором, аргументированы и логично вытекают из результатов проведённых исследований. Материалы, изложенные в диссертации, отражены в виде 7 публикаций в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК РФ. Диссертационная работа Никулицкого С.И. «Изучение экспрессии и локализации рецептора VEGF-R1 в опухолевых и нормальных клетках человека», представляет собой законченной научно-квалифицированной работой в которой на основании выполненных автором исследований разработаны теоретические и практические положения, которые можно характеризовать, как существенный вклад в решение актуальной проблемы в онкологии. Диссертантом представлен завершённый научный труд, который полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» утвержденного Постановления Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г. (в ред. Постановления Правительства РФ от 21.04.2016г. №335, от 02.08.2016 г. №748), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук и может быть представлен к защите на соискание степени кандидата наук по специальности 14.01.12 – «онкология»

Заведующий лабораторией доклинических исследований ГБУЗ «Московский клинический научно-практический центр имени А.С. Логинова ДЗМ»

д.м.н.

Трубицына Ирина Евгеньевна

22.01.19

Подпись официального рецензента, д.м.н. И.Е. Трубицыной заверяю

Ученый секретарь ГБУЗ «Московский клинический научно-практический центр имени А.С. Логинова ДЗМ»

к.м.н. Т.А. Косачева



Сведения о рецензенте: Трубицына Ирина Евгеньевна, д.м.н. заведующая лабораторией доклинических исследований

Место работы: Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы «Московский Клинический научно-практический Центр имени А.С. Логинова» Департамента здравоохранения города Москвы

Адрес учреждения: 111123 г. Москва, шоссе Энтузиастов, д. 86.
Тел. 8 (495) 304-00-70, E-mail: ie.trubitsyna@gmail.com

ОТЗЫВ

доктора биологических наук, профессора **Петра Михайловича Чумакова** на автореферат диссертационной работы Никулицкого С.И. «**Изучение экспрессии и локализации рецептора VEGF-R1 в опухолевых и нормальных клетках человека**», представленной на соискание учёной степени кандидата медицинских наук по специальности 14.01.12 – «онкология»

Диссертационная работа Никулицкого С.И. посвящена изучению молекулярно-биологических свойств и механизмов действия рецептора фактора роста эндотелия сосудов 1 типа – VEGF-R1. Данный рецептор принимает участие не только в опухолевом ангиогенезе, но и, как показано, в регуляции прогрессии злокачественных новообразований. Однако, несмотря на отдельные имеющиеся публикации в этой области, роль VEGF-R1 в канцерогенезе практически не изучена, а имеющиеся сведения во многом противоречивы. Поэтому исследование клеточной локализации и вклада рецептора в опухолевый рост и прогрессию является актуальной научной задачей. Её решение позволит расширить фундаментальные представления о физиологии злокачественной клетки, в частности, о её антиапоптотическом, инвазивном и метастатическом потенциале. А с практической точки зрения, полученные в исследовании результаты могут служить теоретической базой для повышения эффективности диагностики и таргетного лечения онкозаболеваний.

В представленной работе впервые проведена количественная оценка распределения VEGF-R1 и его изоформ по компартментам нормальных и опухолевых клеток человека: на наружной мембране, в цитоплазме и ядре. Установлено, что полноразмерная, или мембранно-связанная, форма рецептора присутствует в ядрах исключительно неопластических, но не нормальных, клеток. Также в исследовании выявлена связь между ядерным содержанием VEGF-R1 и злокачественностью опухолевой линии. Эти факты заставляют по-новому взглянуть на роль рецептора в неопластической клетке. Во-первых, они указывают на интракринный путь стимуляции VEGF-R1 лигандом, а во-вторых, свидетельствуют о том, что именно полноразмерная форма рецептора может вносить вклад в процесс злокачественного перерождения. На основании полученных результатов Никулицкий С.И. предлагает использовать уровень ядерной экспрессии мембранно-связанной изоформы VEGF-R1 в качестве предиктора опухолевой трансформации. Вполне возможно, что в будущем данный маркёр окажется полезным «инструментом» для диагностики и прогнозирования течения онкологических заболеваний.

Особая ценность представленного научного исследования состоит в том, что автором

разработан оригинальный метод, позволяющий детектировать и измерять содержание любого интересующего белка в нативных, хорошо очищенных от цитоплазмы клеточных ядрах, – протокол изоляции чистой фракции интактных ядер, пригодных для анализа на проточном цитометре.

Научные положения, сформулированные автором в диссертации, основаны на глубокой и тщательной проработке значительного репрезентативного материала с применением комплекса современных методов изучения, полностью соответствующих поставленным задачам. Выводы аргументированы и вытекают из результатов проведённых исследований.

Материалы, изложенные в диссертации, отражены в виде 7 публикаций в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК РФ.

Таким образом, содержание автореферата свидетельствует о том, что диссертационная работа Никулицкого С.И. представляет собой завершённый научно-квалификационный труд. Актуальность, научная новизна, теоретическая и практическая значимость и уровень методического решения поставленных задач полностью соответствуют всем требованиям «Положения о присуждении учёных степеней», утверждённого Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. №842 (в редакции постановлений Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 г. №335 и от 2 августа 2016 г. №748), предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени кандидата наук, а её автор Никулицкий Сергей Игоревич достоин присуждения степени кандидата медицинских наук по специальности 14.01.12 – «онкология».

Заведующий лабораторией
пролиферации клеток
Института молекулярной биологии
им. В.А. Энгельгардта Российской Академии Наук,
доктор биологических наук,
профессор
Место работы: 119991, г. Москва,
ул. Вавилова, д. 32.
Телефон: +7(926)7690190
E-mail: chumakovpm@yahoo.com



Чумаков П.М.
14.01.2019

Подпись д.б.н., профессора Чумакова П.М. «заверяю»:
Учёный секретарь
ИМБ РАН,
К.В.Н.



Бочаров А.А.

ОТЗЫВ

доктора биологических наук **Игоря Сергеевича Захарова** на автореферат диссертационной работы Никулицкого С.И. «**Изучение экспрессии и локализации рецептора VEGF-R1 в опухолевых и нормальных клетках человека**», представленной на соискание учёной степени кандидата медицинских наук по специальности 14.01.12 – «онкология»

Поиск и всестороннее исследование перспективных молекулярных мишеней для таргетной терапии опухолей – одна из приоритетных задач современной онкологии. В качестве такой мишени Никулицкий С.И. предлагает рассматривать рецептор фактора роста эндотелия сосудов 1 типа – VEGF-R1, который экспрессируется в большинстве опухолевых клеток и регулирует их выживание, миграцию и метастазирование. Однако в литературе отсутствуют системные данные о локализации, механизмах действия и возможностях ингибирования VEGF-R1 для подавления неопластического роста. Поэтому актуально изучение таких биологических характеристик рецептора, как распределение по клеточным компартментам, механизм активации и передачи сигнала, связь между уровнем экспрессии и злокачественностью клетки.

Целью работы явилось выяснение локализации и молекулярных механизмов действия VEGF-R1 в опухолевых и нормальных клетках человека. Для достижения поставленной цели Никулицкий С.И. использовал целый ряд современных методических подходов. Так, при помощи полуколичественной ОТ-ПЦР и ПЦР в режиме реального времени была выявлена экспрессия гена рецептора в ранее не исследованных в этом отношении линиях опухолевых клеток человека – BRO и A431. Кроме того, благодаря модификации протокола ИЦХ, автору удалось чётко установить, что VEGF-R1 присутствует в ядрах исключительно неопластических клеток. Однако, на мой взгляд, наиболее значимым достижением представленной работы является разработка оригинального способа экстракции нативных клеточных ядер для количественной оценки содержания в них интересующих белков. Этот метод дал возможность не только подтвердить ранее полученные данные иммуноцитохимии, но и выявить связь между уровнем ядерного рецептора и агрессивностью опухоли. А Вестерн-блот-эксперименты показали, что ядерный пул VEGF-R1 представлен его полноразмерной изоформой.

Обнаруженное автором наличие VEGF-R1 в ядре неопластической клетки (и отсутствие в ядре нормальной) говорит о функциональной значимости рецептора для злокачественного роста. Кроме того, внутриклеточная, в том числе ядерная, локализация

VEGF-R1 свидетельствует об интракринном механизме передачи сигнала. Это само по себе достаточно ново: ведь традиционно считается, что тирозинкиназные рецепторы связывают лиганд только на внешней поверхности клетки.

Полученные в работе результаты имеют высокую научно-практическую ценность. Во-первых, содержание VEGF-R1 в ядре можно рассматривать в качестве ещё одного маркера неопластической трансформации клетки в клинической онкологии. А во-вторых, единственно адекватным способом подавления активности рецептора представляется генно-инженерный путь ингибирования. Как вариант такого воздействия, Никулицкий С.И. выдвигает идею о перепрограммировании сплайсинга мРНК VEGF-R1 для снижения уровня полноразмерной изоформы рецептора с компенсаторным увеличением его растворимых форм. Такой подход теоретически позволит добиться как антиангиогенного, так и непосредственно противоопухолевого действия.

В целом идея работы С.И. Никулицкого, её фундаментальная новизна и важность для практической онкологии, а также методическая современность и уникальность полученных результатов, несомненно, заслуживают высокой оценки.

Таким образом, диссертация Никулицкого С.И. представляет собой завершённый научно-квалификационный труд и полностью соответствует всем требованиям «Положения о присуждении учёных степеней», утверждённого Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. №842 (в редакции постановлений Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 г. №335 и от 2 августа 2016 г. №748), предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени кандидата наук, а её автор Никулицкий Сергей Игоревич достоин присуждения степени кандидата медицинских наук по специальности 14.01.12 – «онкология».

Заведующий лабораторией
нейробиологии развития
Института биологии развития
им. Н.К. Кольцова Российской Академии Наук,
доктор биологических наук
Место работы: 119334, г. Москва,
ул. Вавилова, д. 26.
Телефон: +7(499)1355507
E-mail: iszakharov@yandex.ru



Захаров И.С.

01.02.19

Подпись д.б.н., Захарова И.С. «заверяю»:
Учёный секретарь
ИБР РАН,
к.б.н.



Хабарова М.Ю.