

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

кандидата биологических наук, заведующего лабораторией молекулярной онкобиологии федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биологии гена Российской академии наук Татарского Виктора Вячеславовича на диссертационную работу Васильевой Марии Вадимовны на тему «Влияние изменений Notch-зависимых сигнальных путей на свойства клеток солидных опухолей и прогрессию новообразований», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 3.1.6. Онкология, лучевая терапия.

Актуальность темы исследования

Несмотря на прогресс в терапии онкологических заболеваний, выживаемость для многих типов опухолей остается очень низкой. В последнее время особое внимание уделяется не только изменениям в самой опухоли, но и влиянию опухоли на окружающую ткань – строму опухоли, которая репрограммируется за счет сигналов, поступающих от опухоли. Такое изменение микроокружения приводит к формированию благоприятного для опухоли фенотипа, который подавляет иммунный ответ, поддерживает рост опухоли, способствует росту сосудов внутри опухоли, инвазии и метастазированию. Важным компонентом этого процесса является сигнальный путь Notch, который опосредуется лигандами и рецепторами на поверхности клеток. Несмотря на разработку лекарственных средств, направленных на этот сигнальный путь, они не нашли широкого применения из-за большой токсичности. Диссертация Васильевой Марии Вадимовны посвящена изучению влияния Notch-зависимых сигнальных путей на взаимодействие опухоли и ее окружения и обнаружению новых потенциальных мишеней для более направленной терапии Notch-зависимых процессов. Таким образом, тема диссертации является актуальной как с фундаментальной, так и с практической точки зрения.

Научная новизна

В работе Васильевой М.В. впервые показано вовлечение NOTCH1 в поддержание пула и фенотипа опухолевых стволовых клеток (ОСК) в клетках немелкоклеточного рака легкого и рака толстой кишки человека. В работе изучена

P53-зависимая индукция сигнального пути Notch в мезенхимальных клетках под воздействием опухолевых клеток, которая приводит к репрограммированию фенотипа мезенхимальных клеток в про-опухолевый, положительный по α -гладкомышечному актину (α -SMA), также выявлено, что их опухоль-стимулирующая активность опосредована TGF-beta.

Обоснованность и достоверность полученных результатов, выводов и практических рекомендаций

Исследование М.В. Васильевой выполнено на высоком уровне с применением новейших методов клеточной и молекулярной онкологии. Примененные методы статистического анализа обоснованы и подтверждают достоверность полученных данных. Результаты исследования были представлены на 5 международных и российских конференциях и опубликованы в 7 научных статьях, в том числе в 3 статьях в журналах, входящих в список рецензируемых изданий, рекомендованных ВАК. Таким образом, обоснованность и достоверность полученных результатов не вызывает сомнений. Выводы логично вытекают из полученных результатов и обоснованы представленными данными.

Структура и содержание диссертации

Диссертация Васильевой М.В. построена по традиционному принципу и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов исследования, обсуждения результатов, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и условных обозначений и списка литературы. Работа изложена на 107 страницах, проиллюстрирована 42 рисунками и содержит 6 таблиц. Список литературы включает 287 источников, в том числе новейшие статьи по теме диссертации.

Во **введении** автор коротко обосновывает актуальность исследования, ставит цель и задачи исследования.

Затем автор производит **обзор литературы (Глава 1)** по теме исследования. В обзоре описывается структура сигнального каскада Notch и его роль в опухолевой прогрессии, в особенности во взаимодействии опухолевых клеток с микроокружением. Затем описываются подходы к противоопухолевой терапии,

направленной на компоненты сигнального каскада Notch, и в этом разделе особое внимание уделено побочным токсическим эффектам данной терапии. Обзор написан хорошим русским языком, прекрасно проиллюстрирован и содержит ссылки на новейшие научные и клинические исследования.

В следующей главе «**Материалы и методы**» (Глава 2) изложены методические подходы, использованные в исследовании, в частности, полимеразная цепная реакция, иммуноблоттинг, флуоресцентная микроскопия, цитофлуориметрия и другие. Данный раздел показывает высокий методический уровень автора. Методы описаны достаточно подробно для независимого воспроизведения результатов.

Затем автор приводит **результаты исследования** (Глава 3). Вначале автор протестировал пять конструкций, подавляющих экспрессию *NOTCH1*, и по результатам анализа уровня РНК одна конструкция была выбрана для дальнейшей работы. Результаты подавления экспрессии были подтверждены иммуноблоттингом в обеих клеточных линиях. Затем автор показывает, что подавление экспрессии *NOTCH1* снижает скорость пролиферации и частично нормализует контакты между клетками. Помимо этого, в клетках с подавленным *NOTCH1* снижалась способность к колониеобразованию и миграционная активность в камере Бойдена. Также у клеток с подавленным *NOTCH1* значительно снижалась скорость роста ксенографтов и способность к метастазированию у иммунодефицитных мышей.

Затем автор анализирует влияние экспрессии *NOTCH1* на поддержание фенотипа ОСК. В этом разделе показано снижение маркеров ОСК, таких как способность изучаемых клеток к образованию опухолей в животных, снижение активности ABC-транспортеров и количества клеток, экспрессирующих CD133. Также в данных клетках была снижена экспрессия генов, участвующих в эпителиально-мезенхимальном переходе и поддержании плюрипотентности стволовых клеток.

В следующем разделе автор переходит к анализу влияния активности сигнального пути Notch на поведение мезенхимальных клеток человека — фибробластов кожи, десны, крайней плоти, эмбриональных фибробластов (ЭФ) и миофибробластов пупочного канатика (МФпк). Автор исследует количество клеток, положительных по α -SMA, который является маркером опухоль-ассоциированных

фибробластов, и показывает, что процент таких клеток наиболее велик в ЭФ и МФпк. Эти же клетки обладали наибольшей способностью к стимуляции роста подкожных ксенографтов, сформированных клетками линии рака толстой кишки человека HCT116. Также автор сравнил две линии мезенхимальных стволовых клеток (МСК) человека, одна из которых обладала более высоким уровнем NOTCH1. Ко-культивирование NOTCH1-положительных клеток и HCT116, в которых экспрессируется лиганд Notch – JAGGED1, увеличивал в них активность люциферазного репортера к NOTCH1 и процент клеток, экспрессирующих α -SMA. Экзогенная экспрессия NICD1 в NOTCH1-отрицательных клетках также увеличивала экспрессию α -SMA и рост ксенографтов в мышцах.

Затем автор анализирует влияние экспрессии белка P53 на процесс стимуляции опухолевыми клетками сигнального пути Notch. Подавление P53 приводило к снижению уровня α -SMA в NICD1-положительных клетках, но не транскрипционной активности Notch. Экспрессия *NOTCH1* и *NICD1* не влияла на активность P53. Подавление P53 снижало скорость роста опухолей, растущих вместе с NOTCH1-положительными мезенхимальными клетками.

В последней части работы автор разбирает факторы, которые влияют на стимуляцию опухолевого роста через Notch. Автор показывает, что TGF-beta увеличивает процент α -SMA-положительных клеток в культуре МСК и что ко-культивирование HCT116 и МСК увеличивает экспрессию *TGFB1*. Уровень продукции TGF-beta также увеличивался при экзогенной экспрессии *NICD1*. В завершении работы автор показывает, что другие линии опухолевых клеток с высоким уровнем экспрессии лигандов Notch также повышают уровень транскрипционной активности NOTCH1 и долю α -SMA-положительных клеток в NOTCH1-положительных МСК.

Ключевые итоги исследования изложены в разделах «**Заключение**» и «**Выводы**». Автор делает конкретные выводы, которые являются логичными, обоснованными и вытекают из полученных результатов и их обсуждения.

Научно-практическая значимость и внедрение результатов исследования

Работа раскрывает важный механизм перепрограммирования стромы опухолей и может быть использована для создания новых таргетных препаратов, направленных

на этот механизм опухолевой прогрессии. Также маркеры, изученные в работе, могут использоваться для диагностики и создания моделей для тестирования лекарственных кандидатов.

Замечания и вопросы по диссертации

1. Имеются мелкие опечатки и стилистические небрежности. На рисунке 18 нет подписей по осям.

2. Пробовали ли восстановление *NOTCH1*, устойчивого к shРНК, в клетках с shРНК для подтверждения ключевых экспериментов?

3. Могут ли другие рецепторы Notch заменять *NOTCH1* при его подавлении и смотрели ли вы на изменение их уровня при подавлении *NOTCH1*?

4. В работе показано, что уровень P53 важен для механизма Notch-зависимой стимуляции секреции TGF-beta в клетках стромы. Необходима ли для этого активация/модификация P53? Например, как воздействует стабилизация P53 в результате ДНК повреждения на синтез TGF-beta?

5. В работе проверялись линии с высоким уровнем лигандов Notch, и показано, что они увеличивают активацию сигнального пути Notch в МСК. Однако, не взяты клетки с низким уровнем или подавлением таких лигандов. Был ли использован такой контроль?

6. Можно ли предложить новые мишени для более точечной терапии в результате этой работы?

Приведенные в рецензии замечания не снижают научной ценности и практической значимости исследования, проведенного М.В. Васильевой.

Заключение

Диссертационная работа Васильевой Марии Вадимовны на тему «Влияние изменений Notch-зависимых сигнальных путей на свойства клеток солидных опухолей и прогрессию новообразований» является законченной научно-квалификационной работой, в которой на основании проведенных автором исследований решена актуальная задача - показан новый механизм изменения опухолевого микроокружения, что имеет важное фундаментальное и практическое значение для онкологии.

Диссертационная работа соответствует всем требованиям пп. 9-14 «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 20 марта 2021 года № 426, от 11 сентября 2021 г. № 1539, от 26 октября 2023 года № 1786, от 25 января 2024 г. № 62), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 3.1.6. Онкология, лучевая терапия.

Даю согласие на сбор, обработку, хранение и передачу персональных данных в диссертационный совет 21.1.032.01, созданного на базе ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России

Официальный оппонент

Кандидат биологических наук
14.01.12 – Онкология (3.1.6. Онкология,
лучевая терапия в действующей
номенклатуре научных специальностей)
Заведующий лабораторией молекулярной онкобиологии
ФГБУН Институт биологии гена
Российской академии наук

В В

Татарский Виктор Вячеславович
25.02.2025г.

Подпись к.б.н. Татарского В.В. заверяю

Ученый секретарь
ФГБУН Институт биологии гена
Российской академии наук
Доктор биологических наук



Набирочкина Елена Николаевна

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии гена
Российской академии наук
Адрес: 119334, г. Москва, ул. Вавилова, д. 34/5
Тел.: +7 (499) 135-60-89
www.genebiology.ru
info@genebiology.ru