

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

Доктора биологических наук, заведующего лабораторией молекулярной биотехнологии федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации Шмарова Максима Михайловича на диссертацию Пономарева Александра Васильевича «Влияние двух лекарственных форм аранозы на защитные системы опухолевых клеток», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.01.12 – онкология

Актуальность темы

Современная химиотерапия опухолей часто сталкивается с такой проблемой, как лекарственная устойчивость. Поэтому актуален поиск путей повышения противоопухолевой эффективности химиопрепаратов. Препарат араноза «лиофилизат для приготовления раствора для инъекций» применяется при лечении меланомы. Диссертационная работа Пономарева А.В. посвящена изучению новой лекарственной формы аранозы – липосомальной. По данным литературы липосомальные противоопухолевые препараты способны преодолевать лекарственную устойчивость клеток опухоли к свободной форме препарата. Дополнительно в диссертации приведены данные, о том, что липосомальная араноза более цитотоксична для клеток меланомы по сравнению со свободной формой. В связи с этим видна перспективность применения липосомальной формы аранозы, что обосновывает ее более подробное изучение. При этом молекулярные механизмы более высокой цитотоксичности липосомальной аранозы исследованы крайне мало. Изучению этих механизмов посвящена диссертация Пономарева А.В. В работа приведено сравнение воздействия двух лекарственных форм аранозы в клеточных линиях меланомы на экспрессию генов, которые могли бы влиять на лекарственную устойчивость. Статистически значимые различия в экспрессии были характерны для генов

MDM2 и *NFκB1*. Свободная форма аранозы по сравнению с липосомальной повышала экспрессию гена *MDM2* в клетках меланомы, что может способствовать их резистентности к химиотерапии. Белок *NFκB1* по данным литературы способствует гибели клеток в ответ на повреждения ДНК. Липосомальная араноза вызывала повышенную экспрессию гена *NFκB1* в клетках меланомы, по сравнению со свободной лекарственной формой. Оба этих факта проясняют причины более высокой цитотоксичности липосомальной формы аранозы на клеточных линиях меланомы.

Для лечения меланомы в последнее время достаточно эффективно применяется иммунотерапия. Одним из этих методов является блокирование взаимодействия рецептора PD-1 с его лигандами PD-L1 и PD-L2. Молекулы PD-L1 и PD-L2, экспрессирующиеся на поверхности опухолевых клеток или некоторых иммунных клеток способны ингибировать иммунный противоопухолевый T-клеточный ответ. Изучение воздействия химиотерапии на экспрессию молекул PD-L1 и PD-L2, на клетках опухоли является актуальной задачей, так как эти молекулы являются одной из защитных систем опухоли. Дополнительно, сведения об изменении экспрессии молекул PD-L1 и PD-L2 на поверхности опухоли после воздействия химиотерапии могут быть полезны для понимания возможностей сочетания химиотерапии и иммунотерапии. Так как в литературе отмечено, что их эффективность блокаторов взаимодействия рецептора PD-1 с его лигандами PD-L1 и PD-L2 зависит от наличия или отсутствия молекулы PD-L1 в опухоли. В связи с этим в диссертационной работе Пономарева А.В. поставлена актуальная цель – изучение влияния двух лекарственных форм препарата аранозы на защитные системы опухолевых клеток меланомы.

**Обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций,
сформулированных в диссертации**

Для достижения цели диссертации были продуманы обоснованные задачи. Это изучение мутационного статуса гена *TP53*, определение уровней экспрессии генов *TP53*, *MDM2*, *NFκB1*, *NFκB2*, *MyD88* *PD-L1* и *PD-L2* в клеточных линиях

меланомы. Полезную дополнительную информацию дает изучение экспрессии поверхностных белков PD-L1 и PD-L2. Для решения поставленных задач в диссертации применены такие современные методы как работа с клеточными культурами, FISH диагностика, секвенирование по Сенгеру, количественная ПЦР и проточная цитофлуориметрия. С помощью этих методов показано, что мутации гена *TP53* не были связаны с чувствительностью клеток меланомы к аранозе. Уровень экспрессии мРНК *TP53*, *MyD88*, *NFkB2*, *PD-L1* в клетках меланомы не имел статистически значимых различий между воздействием свободной и липосомальной аранозы. Но при этом отмечены важные различия в экспрессии генов *MDM2*, *NFkB1* и *PD-L2* между липосомальной аранозой и свободной. Уровень экспрессии мРНК *MDM2* в после воздействия свободной аранозы выше по сравнению с липосомальной формой. По данным литературы повышенная экспрессия *MDM2* может быть связана с химиорезистентностью опухоли. Уровень экспрессии мРНК *NFkB1* в клетках меланомы наоборот выше после воздействия липосомальной формы аранозы по сравнению со свободной. В литературе отмечено участие белка NFkB1 в гибели клеток в ответ на повреждения ДНК через метилирование. Уровень экспрессии мРНК PD-L2 в клетках меланомы после воздействия аранозы выше по сравнению с липосомальной формой. Повышенная экспрессия PD-L2 может использоваться злокачественными клетками, для уклонения от иммунного надзора. Таким образом, полученные данные раскрывают ранее не известные молекулярные отличия в воздействии свободной и липосомальной аранозы на клетки меланомы.

Достоверность и новизна результатов исследования

Научная новизна диссертации Пономарева А.В. заключается в том, что впервые показаны молекулярные механизмы способные объяснить повышенную цитотоксичность липосомальной аранозы по сравнению со свободной на клетках меланомы. Свободная араноза запускает механизмы устойчивости к химиотерапии, через повышение экспрессии мРНК *MDM2*, и к цитотоксическим лимфоцитам, через повышение экспрессии мРНК *PD-L2*. Однако, в липосомальной лекарственной форме араноза, наоборот, запускает механизмы,

способствующие чувствительности клеток к терапии, через повышение экспрессии мРНК *NFκB1* – фактора гибели клеток в ответ на повреждение ДНК, и снижает экспрессию мРНК *PD-L2*, что может повысить чувствительность опухоли к цитотоксическим лимфоцитам.

Диссертационная работа является важным научным исследованием. Представленные в работе теоретические положения основаны на глубоком и тщательном анализе литературных данных. Для решения поставленных задач применены современные методы. Представленный объем экспериментальных данных обеспечивает достоверность результатов исследования и сформулированных выводов.

Оценка содержания диссертации, ее завершенности.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. В соответствии с паспортом специальности 14.01.12 – «Онкология» в диссертационной работе проведены исследования, соответствующие пунктам 2; 6.

Диссертационная работа изложена на 109 страницах, написана в традиционном стиле и состоит из введения, обзора литературы, главы собственных исследований с обсуждением полученных результатов, выводов, списка цитируемой литературы, состоящего из 236 источников из них 213 – иностранные. Работа иллюстрирована 12 таблицами и 19 рисунками.

В разделе «Обзор литературы» представлены данные по лекарственной устойчивости метастатической меланомы, освещены известные механизмы лекарственной устойчивости опухолевых клеток к производным нитрозомочевины. Также на основании материалов отечественных и зарубежных исследователей обобщены сведения о способах преодоления лекарственной устойчивости липосомальными противоопухолевыми препаратами. Отдельная глава литературного обзора посвящена сигнальным белкам, участвующим в процессах клеточной гибели (P53, MDM2, MyD88, NF-κB1, NF-κB2). Заключительная глава обзора обобщает имеющиеся в литературе данные по подходам к иммунотерапии меланомы, в том числе по блокированию PD-1.

В Разделе «Материалы и методы исследования» представлены описания материалов и оборудования, использованных при выполнении диссертационной работы, объектов и методов исследования, условия постановки реакций и алгоритма статистической обработки получаемых данных.

В разделе «Результаты исследований» диссертантом подробно описан ход собственных исследований диссертанта. Глава разбита на подразделы, соответствующие решенным экспериментальным задачам.

В разделе «Обсуждение результатов исследований» научные факты и экспериментальные данные проанализированы и обсуждены по всем направлениям проведенных исследований, результаты подвергнуты сравнительному анализу, что свидетельствует о завершенности научного исследования.

В «Заключении» автор кратко излагает основные результаты своей работы и отмечает следующее. Полученные результаты демонстрируют, что две лекарственные формы аранозы – липосомальная и лиофилизат для приготовления раствора для инъекций – в определенных случаях оказывают различное воздействие на внутриклеточные сигнальные пути в клетках метастатической меланомы. Араноза-лио запускает механизмы устойчивости к химиотерапии, через повышение экспрессии мРНК MDM2, и к цитотоксическим лимфоцитам, через повышение экспрессии мРНК PD-L2. Липосомальная араноза, наоборот, запускает механизмы, способствующие чувствительности клеток к терапии, через повышение экспрессии мРНК NFκB1 – фактора гибели клеток в ответ на повреждение ДНК, и повышает чувствительность к цитотоксическим лимфоцитам через снижение экспрессии мРНК PD-L2.

Выводы логически вытекают из результатов собственных исследований и обобщают весь объем информации. В автореферате и трех опубликованных статьях отражено основное содержание работы.

Материалы, изложенные в диссертации, подтверждают, что автор справился с поставленными задачами.

Заключение

Таким образом, диссертационная работа Пономарева А.В. «Влияние двух лекарственных форм аранозы на защитные системы опухолевых клеток» является законченной научно-квалификационной работой, выполненной под руководством доктора биологических наук А.В. Мисюрина и кандидата фармацевтических наук М.А. Барышниковой, содержащей решение актуальной научной задачи – изучение молекулярных механизмов проясняющих различия в воздействии двух лекарственных форм аранозы на клетки меланомы, имеющей существенное значение для поиска возможностей преодоления резистентности опухоли к химиопрепаратам.

По новизне, научной и практической ценности полученных результатов диссертация 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), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор А.В. Пономарев, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.01.12 – Онкология.

Заведующий лабораторией
молекулярной биотехнологии ФГБУ
«НИЦЭМ им.Н.Ф.Гамалеи» Минздрава России
доктор биологических наук (14.03.09 и 03.01.06)

 Шмаров М.М.

Подпись доктора биологических наук Шмарова М.М. заверяю
Ученый секретарь ФГБУ
«НИЦЭМ им.Н.Ф.Гамалеи» Минздрава России
кандидат биологических наук

01.03.2020

 Кожевникова Л.К.

Москва, 123098, ул. Гамалеи, д. 18
Телефон: 8(499)193-3001
E-mail: info@gamaleya.org