

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук Гуляевой Людмилы Федоровны, руководителя лаборатории молекулярных механизмов канцерогенеза Федерального исследовательского центра «Фундаментальная и трансляционная медицина», на диссертационную работу Малек Анастасии Валерьевны на тему «Возможности применения нановезикулярных технологий в онкологии», представленной на соискание учёной степени доктора медицинских наук по специальности 14.01.12 — онкология

Актуальность темы

Онкологические заболевания по-прежнему занимают лидирующие позиции в структуре заболеваний человека как по частоте заболеваемости, так и по смертности. Это делает актуальным исследования, посвященные поиску новых маркеров онкозаболеваний, как для диагностики, так прогноза и лечения. Одним из перспективных маркеров могут быть циркулирующие нановезикулы, которые можно выявлять на разных стадиях заболевания, в том числе на его начальных стадиях. В последние годы, в связи с бурным развитием современных молекулярно-биологических технологий, ведутся активные исследования циркулирующих нановезикул, особенно их роли в процессах метастазирования. Однако эта проблема только в начале пути, поэтому она требует проведения дальнейших исследований, особенно применения в практической онкологии. Остаются открытыми вопросы методов выделения нановезикул, тщательной характеристики состава, а также разработки диагностических методов, основанных на анализе биохимического состава циркулирующих нановезикул. Все эти вопросы поставлены в диссертационной работе, что делает ее современной и актуальной.

Содержание работы

Диссертационная работа Малек Анастасии Валерьевны состоит из введения, пяти глав, каждая из которых содержит обзор литературы, заключения, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы, включающего 353 источника, и списка иллюстраций.

Первая глава содержит обзор современной научной литературы, посвященной истории открытия и современной систематике внеклеточных нановезикул. Учитывая сложность идентификации нановезикул, автор детально рассматривает методы визуализации и анализа внеклеточных нановезикул (ВНВ). Здесь же автор анализирует биогенез, физиологические функции ВНВ, и их роли ВНВ в развитии онкологических заболеваний, в частности, патологические эффекты опухолевых экзосом. В заключение автор делает вывод, что экзосомы играют важную роль во многих физиологических процессах, а также в развитии и прогрессировании онкологических заболеваний. Автор формулирует и обосновывает задачи работы, в соответствии с которыми структурирована основная часть диссертации.

Во второй главе Анастасия Валерьевна анализирует проблемы разработки методов выделения ВНВ из различных биологических жидкостей. Были получены важные результаты, показывающие, что метод выделения экзосом из мочи с целью последующего анализа экзосомальных микроРНК с помощью лектинов является простым, экономичным и может быть рекомендован для дальнейшего использования. Автор показала, что перспективным методом выделения экзосом из плазмы для анализа экзосомальных микроРНК методом ОТ-ПЦР является модифицированная технология двухфазного разделения (патент 27417765). Другим перспективным методом для анализа поверхностных белковых маркеров проточной цитометрией является технология на основе аптамеров (патент 2741638).

В третьей главе автором проведен анализ диагностического потенциала экзосомальных микроРНК. Здесь представлены результаты разработки методов диагностики онкологических заболеваний (колоректальной карциномы, рака предстательной железы) и метода дифференциальной диагностики узловых образований щитовидной железы. Автором была проведена оценка возможной корреляции между наличием потенциальных «маркерных» миРНК в экзосомах плазмы и уровнем экспрессии их в ткани папиллярного РЩЖ. В третьей главе представлен метод прогнозирования эффекта нео-адьювантной терапии при раке молочной железы. В итоге, была проведена валидация полученных результатов и оценка клинической значимости анализа экзосомальных микроРНК.

Четвертая глава посвящена исследованию функциональных характеристик циркулирующих ВНВ. Автором был проведен анализ особенностей биохимического состава поверхности ВНВ плазмы, идентифицированы компоненты, участвующие в процессе взаимодействия везикул и опухолевых клеток, в условиях *in vitro* и *in vivo* экспериментов исследованы молекулярные механизмы и результаты этого взаимодействия. Автором получены научные данные фундаментального характера, на основе которых сделаны выводы о перспективах создания новых методов профилактики и/или лечения процесса метастатической диссеминации.

Наконец, в последней главе представлены результаты работы по созданию оригинальной системы «доставки» терапевтических молекул РНК в клетки опухоли. Преимущества предложенной «системы доставки» на основе экзосом продемонстрированы в ряде *ex vivo*, *in vitro* и *in vivo* экспериментов.

Следует отметить, что каждая из четырех глав представляет результаты собственных исследований, на основании которых проводится оценка

возможностей применения нано-везикулярных технологий в онкологической практике.

**Степень обоснованности научных положений и выводов,
сформулированных в диссертации, их достоверность и новизна.**

Автором вынесены на защиту четыре пункта научных положений, которые соответствуют четырем главам диссертации.

В первом положении автор утверждает, что «методы выделения ВНВ (экзосом) из биологических жидкостей могут быть оптимизированы для решения определенных аналитических задач и использования в рутинной клинической практике». Актуальность этого положения определяется известными техническими сложностями работы с наноразмерными биологическими объектами. Например, международное общество, объединяющее исследователей нановезикул, (International Society of Extracellular Vesicles, ISEV) регулярно публикует требования к протоколам и технологиям, которые должны обеспечивать «сопоставимость» научных данных, полученных в разных лабораториях. Очевидно, что внедрение нановезикулярных технологий в клиническую практику потребует еще более жесткой стандартизации. Поэтому упрощение и адаптация методов выделения нановезикул к конкретным аналитическим задачам необходима. Разработкой нескольких новых методов автор обосновала первое из четырех положений.

Следующее положение основано на результатах исследования большой коллекции биологического материала от пациентов с онкологическими заболеваниями. Исследования были сфокусированы на анализе везикулярных микроРНК, и автор показала, что эти молекулы могут иметь высокий диагностический потенциал при раке предстательной железы и колоректальном раке. В исследовании проведена оценка возможности использования методов анализа везикулярных микроРНК для дифференциальной диагностики узловых образований щитовидной железы и для прогноза эффекта нео-адьювантной терапии рака молочной железы.

Полученные результаты дают основание утверждать, что везикулярные микроРНК представляют собой перспективные маркеры, на основе которых могут быть созданы тест-системы для первичной и дифференциальной диагностики онкологических заболеваний.

Третье положение имеют более фундаментальный характер и основано на результатах большой экспериментальной работы. Так, результаты *in vitro* и *in vivo* экспериментов, проведенных с использованием двух стабильных линий клеток рака молочной железы и эмбрионов рыб данио-рерио, ясно продемонстрировали стимулирующий эффект, который оказывают нановезикулы плазмы на опухолевые клетки. Выводы, сделанные автором, основаны на представленных экспериментальных результатах. Автор выносит на защиту положение о том, что нормальный пул ВНВ плазмы стимулирует адгезивную и миграционную активность опухолевых клеток и может играть патологическую роль в процессе метастатической диссеминации. Положение представляется обоснованным, но имеет пока скорее научное, нежели практическое значение.

Заключительное положение основано на результатах исследования возможности использования ВНВ для оптимизации характеристик систем «доставки» терапевтических молекул РНК. Автором разработана оригинальная композиция трансфекционного комплекса, «ядро» которого формирует негативно заряженный синтетический полимер и РНК, а «оболочкой» является мембрана ВНВ. Результаты экспериментов подтверждают эффект повышения стабильности комплексов, «упакованных» в везикулярную мембрану. Результат сравнения трансфекционной активности комплексов, образованных ВНВ разных клеточных линий, представляется интересным научным наблюдением, которое требует дальнейших исследований. Выводы, сделанные автором, соответствуют представленным результатам. Результаты анализа характеристик, структурных и функциональных, системы доставки терапевтических РНК на основе

полимеров и нановезикул обосновывают заключительное положение, вынесенное автором на защиту.

В целом, представленные в диссертационной работе научные данные являются новыми, они открывают перспективы разработки новых методов диагностики и новых подходов к профилактике или терапии онкологических заболеваний.

Практическая значимость результатов исследования

Полученные автором результаты во многом имеют практическое значение. Предложенные протоколы выделения экзосом из плазмы с целью последующего анализа экзосомальных микроРНК или белков могут найти применение в практике исследовательских лабораторий и могут быть интегрированы в диагностические тест-системы, которые имеют очевидные перспективы клинического применения.

В рамках проведенной оценки диагностического потенциала экзосомальных микроРНК, автором определены потенциальные «маркеры» различных онкологических заболеваний и определены пути повышения диагностического потенциала методики в целом. Так, в рамках исследования показано, что выделения из плазмы ткане-специфичных фракций везикул может повысить чувствительность методов диагностики.

Высокий потенциал практического применения пока в лабораторной, а позднее и в клинической практике, имеют результаты заключительного раздела диссертации. Автором предложен новый метод «упаковки» трансфекционных комплексов, состоящих из терапевтических микроРНК и катионных полимеров, в экзосомы. Как показано автором работы, такая «упаковка» повышает стабильность комплексов, снижает их токсичность. С учетом того, что отсутствие приемлемых «систем доставки» является одним из основных факторов, тормозящих внедрение технологии РНК-интерференции в клинической практике, представленные результаты имеют очевидную практическую значимость. Так как экзосомы опосредуют

межклеточный транспорт микроРНК в физиологических условиях, использование этих везикул в качестве «переносчиков» терапевтических молекул РНК представляется перспективной стратегией.

Замечания:

Принципиальных замечаний к работе нет.

Вопросы для дискуссии:

1. Хотелось бы знать мнение автора, меняется ли состав и количество внеклеточных везикул при заборе биологических жидкостей в динамике. Достаточно ли одноразового забора для применения в клинической практике?
2. В работе автор не анализирует возможные ошибки разработанных методов при проведении клинического анализа. Из работы следует, что все разработанные методы практически идеальны для анализа.

Заключение

Диссертация Малек Анастасии Валерьевны «Возможности применения нановезикулярных технологий в онкологии» является законченной, самостоятельно выполненной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение ряда задач, имеющих потенциальное или практическое значение для онкологии.

По своей актуальности, новизне, научно-практической значимости диссертация Малек Анастасии Валерьевны полностью 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 доктора наук, а ее автор

заслуживает присуждения ученой степени доктора медицинских наук по специальности 14.01.12 – Онкология.

Руководитель лаборатории молекулярных механизмов канцерогенеза Федерального исследовательского центра «Фундаментальная и трансляционная медицина», доктор биологических наук, профессор

Гуляева Л.Ф.

«7» сентября 2021 года

Подпись доктора биологических наук Гуляевой Л.Ф. «заверяю»

Учёный секретарь

ФИЦ ФТМ, д.б.н.



Пальчикова Н.А.