

## **ОТЗЫВ**

официального оппонента доктора медицинских наук Юнусовой Натальи Валерьевны, ведущего научного сотрудника лаборатории биохимии опухолей Научно-исследовательского института онкологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук» (НИИ онкологии Томского НИМЦ) 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**

За последние годы разработаны и введены в клиническую практику ряд новых технологий скрининга, диагностики и терапии онкологических заболеваний. Не смотря на очевидные успехи фундаментальной и практической онкологии, онкологические заболевания сохраняют лидирующие позиции в статистике заболеваемости и нетравматической смертности населения планеты и нашей страны. Это определяет необходимость разработки принципиально новых методов диагностики и терапии онкологических заболеваний.

Циркулирующие нановезикулы являются перспективными диагностическими маркерами, так как мульти-молекулярный состав может определять их существенно более высокую специфичность по сравнению с традиционными молекулярными онкомаркерами. Возможность ранней диагностики и/или мониторинга эффекта терапии солидных опухолей путем анализа циркулирующих экзосом была показана в сотнях исследовательских работ, в настоящее время ряд методов проходят клинические испытания. Разработка новых подходов системной терапии онкологических заболеваний также представляется областью активных исследований, хотя перспективы

клинического применения нановезикулярных технологий в контексте лечения онкологических пациентов еще требуют углубленных исследований. Тем не менее, оценка возможностей применения в практической онкологии методов выделения, анализа, контролируемой модификации состава циркулирующих нановезикул представляется актуальной темой диссертационного исследования.

### **Содержание работы**

Диссертационная работа написана в монографическом стиле и состоит из введения, пяти глав, заключения, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы, включающего 353 источника, и списка иллюстраций.

В первой главе автором представлен детальный обзор современной научной литературы, посвященной объекту исследования в целом. С учетом новизны тематики работы выделение такого обзора в отдельную главу представляется целесообразным. В этой главе автор описывает историю «науки о везикулах», современные принципы классификации внеклеточных везикул. С учетом важности методологических аспектов работы с наноразмерными объектами, раздел обзорной главы посвящен описанию методов визуализации и анализа внеклеточных нано-везикул (ВНВ). Автор представила анализ современной литературы, посвященной биогенезу, физиологическим функциям ВНВ, и роли ВНВ в развитии онкологических заболеваний. На основе глубокого обзора литературы, автор формулирует и обосновывает задачи работы, в соответствии с которыми структурирована основная часть диссертации. В четырех последующих главах изложены результаты работы, причем в силу смысловых различий и методологических подходов, каждая глава содержит сфокусированный обзор литературы, раздел, описывающий материалы и методы, полученные результаты и выводы.

Так, глава 2 посвящена разработке и оптимизации методов выделения ВНВ из биологических жидкостей. Причем автором сделан акцент на



применимости разработанных технологий в рутинной практике. В рамках этой главы описан стандартный метод выделения ВНВ из плазмы с помощью ультра-центрифугирования и предложены три оригинальные технологии, из которых две «защищены» патентами.

Глава 3 посвящена анализу диагностического потенциала циркулирующих везикул, в частности, представлены результаты разработки методов первичной диагностики колоректального рака, рака предстательной железы, дифференциальной диагностики узловых образований щитовидной железы и прогноза эффекта нео-адьювантной терапии рака молочной железы на основе анализа экзосомальных микроРНК. В рамках этой части исследования автором был проведен анализ большого количества биологического материала (мочи и плазмы) от онкологических пациентов и доноров.

В главе 4 изложены результаты исследования роли нормального пула циркулирующих ВНВ в процессе метастатической диссеминации. Эта часть исследования имеет преимущественно экспериментальный характер: исследован состав поверхности ВНВ, проведен анализ эффектов и механизмов взаимодействия опухолевых клеток и ВНВ в условиях *in vitro* и *in vivo* экспериментов. Результаты этой главы имеют фундаментальный характер, но позволяют сформулировать выводы относительно возможностей и перспектив разработки новых подходов профилактики и/или лечения процесса метастатической диссеминации.

Последняя, пятая глава описывает результаты разработки новой системы «drug delivery» на основе ВНВ. Эта глава описывает оригинальную структуру комплекса для «упаковки» терапевтических молекул РНК с помощью катионных полимеров и ВНВ, представлены результаты работы по оптимизации протокола формирования такого комплекса, результаты оценки его физических и функциональных характеристик.

Каждая из четырех глав, описывающих результаты исследования, завершается контекстными выводами и оценкой перспектив практического

применения. В заключении автор проводит анализ всех полученных результатов, излагает свою оценку возможностей применения нановезикулярных технологии в онкологии. В целом, структура работы представляется логичной и удобной для восприятия представленного материала.

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

В представленной работе оценивались перспективы внедрения в практическую онкологию ряда инновационных подходов, основанных на выделении из биологических жидкостей, анализе и модификации наноразмерных мембранных везикул. Для достижения поставленной цели автором было разработано несколько новых методик, при этом в качестве основных критериев были заявлены технологичность и относительно низкая стоимость, что определяет возможность внедрения разработанных технологий в рутинную клиническую практику. Представленные результаты обосновывают положение (1) о том, что методы выделения ВНВ могут быть оптимизированы с учетом конкретных аналитических задач и использования в рутинной лабораторной практике. С учетом детального описания разработанных технологий, касающиеся эффективности предложенных методов, также представляются обоснованными.

В рамках разработки методов диагностики, основанных на анализе циркулирующих экзосом, автором был впервые показан диагностический потенциал ряда экзосомальных микроРНК, в частности miR-574, miR-141, miR-21 (для диагностики рака предстательной железы), miR-223, miR-181a (для диагностики колоректальной карциномы). С учетом представленных показателей диагностической специфичности и чувствительности предложенных методов выводы автора, о перспективах разработки новых методов скрининга и/или диагностики этих заболеваний представляется вполне обоснованными. Автором также проведена оценка возможности



использования везикулярных микроРНК в качестве маркеров дифференциальной диагностики узловых образований щитовидной железы и маркеров прогноза эффекта нео-адьювантной терапии рака молочной железы. Результаты этих исследований оказались скромнее, и автор сделала объективные выводы о перспективах применения предложенных методов в практике и возможностях их оптимизации. Так, дополнительные параграфы этой главы посвящены оценке эффекта выделения отдельных везикулярных популяций и разработке оригинального высоко-специфичного метода ОТ-ПЦР анализа микроРНК. Сделанные выводы логично вытекают из представленных результатов. Положение о перспективности разработки маркеров на основе везикулярных микроРНК, выносимое автором на защиту представляется вполне обоснованным.

В рамках диссертационной работы было впервые проведено исследование роли нормального пула циркулирующих экзосом в процессе метастатической диссеминации и получены новые научные данные, указывающие патологический (про-метастатический) эффект взаимодействия циркулирующих опухолевых клеток и ВНВ. Выводы, сделанные автором, основаны на представленных экспериментальных результатах.

В работе был также предложен новый подход к решению проблемы «доставки» терапевтических молекул РНК путем «упаковки» полимерного комплекса (РНК/полиэтиленмин) в ВНВ. Автором предложена оригинальная композиция трансфекционного комплекса, описан протокол формирования, результаты анализа физических и функциональных характеристик комплекса. Экспериментальные данные доказывают факт повышенной стабильности комплексов «упакованных» в везикулярную мембрану, эффективность трансфекции РНК показана в моделях *in vitro* и *in vivo*. Вызывают интерес результаты сравнения трансфекционной активности комплексов, образованных везикулами, секретлируемыми разными клеточными линиями. Выводы, сделанные автором, соответствуют представленным результатам. Положение, о том, что «упаковка»

трансфекционных комплексов на основе катионных полимеров в ВНВ оптимизирует функциональные характеристики последних, представляется обоснованным.

В целом, диссертационное исследование показывает практическую возможность и перспективность внедрения новых нановезикулярных технологий в различные области практической онкологии, чем определяется его научная новизна.

### **Практическая значимость результатов исследования**

Разработанные протоколы выделения ВНВ из биологических жидкостей применимы для решения практических задач (анализа везикулярных микроРНК методом ОТ-ПЦР и анализа везикулярных белков методом проточной цитометрии) могут быть рекомендованы для научных и доклинических исследований. Предложенные автором диагностические подходы еще требуют масштабной клинической валидации, что выходит за рамки диссертационной работы. Практическая значимость данной части исследования заключается в разработке технологии анализа везикулярных микроРНК и демонстрации его диагностического потенциала.

Практическая значимость результатов исследования участия ВНВ плазмы в процессе метастатической диссеминации становится понятной с учетом того факта, что в 2020 году компанией Aethlon Medical Inc. были начаты клинические испытания технологии «удаления» ВНВ в комбинации с иммунотерапией для пациентов с опухолями головы и шеи (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04453046: Hemopurifier Plus Pembrolizumab in Head and Neck Cancer).

### **Замечания и дискуссионные вопросы:**

Замечаний к методической части работы и проведенным молекулярно-биологическим исследованиям нет, они безупречны, однако есть замечания по клинической части работы.



1. По разделу, где представлены результаты по использованию экзосом для диагностики рака простаты, необходимо уточнить стадию рака по TNM. Кроме того, для включения мужчин в группу здоровых доноров для выполнения этого раздела работы совершенно недостаточно только констатации уровня ПСА ниже 4 нг/мл. Для исключения РПЖ и предраковой патологии простаты необходимо как минимум ТРУЗИ, а оптимально ТРУЗИ в сочетании с МРТ и тонкоигольной биопсией подозрительных участков. По данным зарубежных авторов у мужчин старше 60 лет с нормальным ПСА вероятность обнаружения РПЖ достигает 6-8%.
2. Раздел по роли экзосом в предсказании эффективности НАХТ. Необходимо представить данные по молекулярным подтипам рака для обоснования проведения НАХТ, стадия – не показания для проведения НАХТ. В соответствии с рекомендациями RUSSCO (2017) предоперационная лекарственная терапия при первично операбельном РМЖ позволяет выполнить органосохранную операцию, улучшить прогноз в случае достижения полной морфологической регрессии (по сравнению с больными без полной морфологической регрессии) при трипл-негативном и HER2-положительном (не люминальном) подтипах РМЖ, оценить эффект лекарственной терапии и своевременно ее прекратить или скорректировать. В работе представлена неклассическая оценка эффективности НАХТ при РМЖ. Оценка эффективности НАХТ осуществляется обычно по шкале RECIST (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors, 2000) по результатам клинического осмотра УЗИ молочных желез и маммографии. Непосредственная эффективность лечения оценивается по сумме полных и частичных регрессий опухоли, наличие стабилизации и прогрессирования заболевания рассматривают как отсутствие эффективности лечения. Иногда для оценки эффективности НАХТ оценивают выраженность лекарственного патоморфоза в ткани молочной железы и регионарных лимфатических узлах оценивалю по классификации, предложенной Лушниковым Е.Ф. от 1977 года или ее зарубежным аналогам. Диагноз «полная морфологическая регрессия»

- complete response устанавливается при отсутствии опухолевых элементов, как в ткани молочной железы, так и в исследуемых л/у. Все остальные варианты – по response. Если бы это было выполнено на имеющемся клиническом материале (47 больных), то это бы значительно повысило ценность выполненной работы и ее публикационный потенциал.

Также хотелось бы задать автору ряд вопросов в плане дискуссии:

1. При выделении ВНВ из плазмы крови на частицах с аптамерами, почему использовался ДНК-аптамер к CD63? Известно, что CD63 экспрессируется только в 1/3 тотального пула экзосом, гораздо чаще экспрессируются CD9 и CD81.
2. В таблице №7, где представлены показатели диагностической значимости miRNA в экзосомах мочи, показатели чувствительности варьируют от 0,47 до 0,71. Что, на Ваш взгляд, можно сделать для повышения чувствительности этих тестов?
3. Чем может быть объяснена большая, по сравнению с экзосомами от других клеточных линий, трансфекционная активность клеток карциномы яичника Scov-3?
4. Какие мажорные белки плазмы крови абсорбируются на поверхности экзосом и какого рода влияния (стимулирующее, ингибирующее, иммуносупрессивное) такие экзосомы могут оказывать на ЦОКи? Почему точка приложения именно ЦОКи, а не на другие клетки?

### **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.

Официальный оппонент:

Ведущий научный сотрудник лаборатории биохимии опухолей НИИ онкологии Томского НИМЦ,  
доктор медицинских наук

Юнусова Н.В.

«15» сентября 2021г.

Подпись доктора медицинских наук  
Юнусовой Н.В. «заверяю»

Учёный секретарь Томского НИМЦ,  
кандидат биологических наук



Хитринская И.Ю

Контактная информация:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук» (Томский НИМЦ); 634009. г. Томск, пер. Кооперативный, д. 5; тел.: 8 (3822) 51-33-06; e-mail: center@tnimc.ru; сайт: www.tnimc.ru