

## **ОТЗЫВ**

**официального оппонента на диссертацию, представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук Алхаддад Лины на тему: «Клеточно-молекулярные механизмы радиорезистентности немелкоклеточного рака легких и мультиформной глиобластомы человека» по специальности 1.5.1 – «Радиобиология»**

### **Актуальность исследования**

Одной из нерешенных проблем современной лучевой терапии является ее недостаточная эффективность при лечении высоко резистентных опухолей, устойчивость которых к облучению может быть как природной, так и развивающейся в процессе лечения. Формирование популяций высоко радиостойчивых опухолевых клеток возможно в результате их селекции в процессе длительного курса облучения опухоли фракциями по 2 Гр или в режиме гиперфракционирования с увеличением дозы разового воздействия до достижения суммарной дозы на опухоль 40 – 60 Гр. К радиорезистентным типам опухолей относятся опухоли головы и шеи, некоторые опухоли молочных желез, немелкоклеточный рак легких (НМРЛ) и мультиформная глиобlastома (ГБ). Молекулярные особенности, определяющие высокую радиостойчивость опухолевых клеток, и механизмы их развития в процессе и традиционной, и стереотаксической лучевой терапии в значительной мере остаются неизученными. Поэтому тема диссертационной работы Л. Алхаддад, цель которой сформулирована, как выявление и характеристика клеточно-молекулярных особенностей формирования адаптационного ответа на стресс, индуцированный ионизирующим излучением, в клеточных линиях НМРЛ и ГБ, имеющих различную радиационную устойчивость и наличие/отсутствие функционально активных генов-онкосупрессоров, безусловно, является высоко актуальной.

Для достижения поставленной цели автором были сформулированы следующие задачи.

1. Получить и охарактеризовать фенотип субклиний клеток НМРЛ А549 (ген p53 дикого типа) и Н1299 (p53-дефицитные), выживших и поддерживающих устойчивый рост после фракционированного облучения в суммарной дозе 60 Гр.

2. Охарактеризовать клеточно-молекулярные особенности адаптационного ответа полученных субклиний НМРЛ на стресс, индуцированный дополнительным облучением.

3. Провести сравнительный анализ молекулярных маркеров эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП) в родительских и полученных изогенных субклинциях клеток НМРЛ.

4. Провести сравнительный анализ полиплоидии и уровней экспрессии связанного с FOS антигена-1 (FRA1) - белка транскрипционного комплекса AP-1, и транскрипционных факторов p63/p73 - белков семейства p53, в тех же клеточных линиях;

5. Изучить клеточно-молекулярные эффекты, индуцируемые однократным облучением в дозах 2, 4 и 6 Гр в клетках ГБ, имеющих наиболее распространенный набор мутаций в генах онко-супрессорах TP53 и PTEN, а именно, клеточных линиях U87 (TAp53wt/PTENmut), LN229 (TAp53mut/PTENwt), U251 (GOF p53mut /PTENmut).

**Научная новизна исследования и научно-практическая значимость полученных результатов.**

Автором впервые получены и охарактеризованы радиорезистентные субклинии клеток НМРЛ после фракционированного облучения исходных линий клеток НМРЛ А549 (ген p53 дикого типа) и Н1299 (p53-дефицитные) при разных схемах фракционирования, и показано, что режим фракционирования с увеличением дозы может приводить к формированию более резистентных клеток, чем использование обычного режима. Такие клетки при их сохранении в опухоли после облучения могут приводить к рецидивам с формированием более резистентных опухолей. Молекулярный портрет полученных резистентных субклиний НМРЛ, как показала автор,

может быть весьма разнообразным. При изучении линий ГБ впервые показано, что их облучение терапевтическими дозами изменяет экспрессию белков p63 и p73 в соответствии с наличием/отсутствием мутаций в генах TAr53/PТЕН в этих клетках. Автор впервые рассматривает формирование сенесцентных полиплоидных клеток ГБ как способ выживания клеток ГБ после облучения. Впервые показано, что образование полиплоидных клеток в сублиниях НМРЛ исходно TAr53wt зависит от режима фракционирования, в то время как в отсутствие гена TAr53 увеличение доли таких клеток мало зависит от режима облучения. Полученные данные могут быть использованы при планировании лучевой терапии в соответствии с результатами фенотипирования опухоли.

**Степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.**

Представленные научные данные и сделанные по результатам работы выводы основаны на достоверных результатах, базирующихся на большом фактическом материале. Достоверность полученных результатов не вызывает сомнений. Она определяется большим фактическим материалом исследований, достаточным количеством проведенных экспериментов, использованием современных методов исследований, адекватных статистических методов обработки результатов и глубоким анализом полученных материалов в сравнении данными литературы в исследуемой области.

### **Оценка содержания диссертации**

Диссертационная работа Л. Алхаддад построена по классическому принципу и включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, описание полученных результатов, обсуждение, выводы и список литературы.

Обзор литературы занимает 42 стр. и посвящен следующим вопросам: анализу роли лучевой терапии в лечении НМРЛ и ГБ человека, проблеме гетерогенности и пластичности опухолевых клеток, анализу представлений

об опухолевых стволовых клетках (ОСК) и их роли в возникновении и прогрессировании опухолей, вопросам перекрестных взаимодействий между ОСК и их нишами, характеристике процесса эпителиально-мезенхимального перехода, анализу основных механизмов репарации двунитевых разрывов ДНК и их роли в судьбе клетки, проблеме радиационно-индуцированного преждевременного старения опухолевых клеток и роли полиплоидных/многоядерных гигантских опухолевых клеток (ПГОК/МГОК) в метастазировании и рецидиве после противоопухолевого лечения. Обзор хорошо написан, хотя, как и другие разделы, не лишен опечаток, простительных для автора, для которого русский язык не является родным. Он легко читается, охватывает современные представления по анализируемым вопросам и позволяет читателю составить представление о состоянии изучаемых автором многоплановых проблем.

Раздел "Материалы и методы исследования" (14 стр.) содержит подробное описание всех использованных автором материалов и методов. Все описанные методы адекватны поставленным задачам. Замечание можно сделать только в отношении метода 2.10 «Активность оксидоредуктаз клеток (МТТ тест)» в отношении которого автор указывает, что «Изменение активности оксидоредуктаз клеток регистрировали по снижению оптической плотности». В то же время в использованной постановке метода снижение оптической плотности определяется не столько изменением активности ферментов, сколько изменением количества клеток из-за их гибели или остановки пролиферации.

Полученные Линой Алхаддад результаты изложены в 16 разделах (40 стр.), которые завершаются их подробным обсуждением (20 стр.) и выводами.

Первая часть работы касается изучения сублиний клеток НМРЛ линии А549 (исходно р53<sup>wt</sup>) и Н1299 (исходно р53<sup>0</sup>), полученных в результате длительного фракционированного облучения в режиме повышения дозы

(A549DE и H1299DE) и при обычном фракционировании дозы по 2 Гр за 30 фракций (A549S и H1299S) до суммарной дозы 60 Гр.

Автором показано, что выжившие, исходно p53<sup>wt</sup> клетки A549DE и A549S при культивировании в виде прикрепляющейся культуры стали более резистентными к облучению в дозах 2–6 Гр, в то время как выжившие исходно p53<sup>0</sup> клетки H1299 стали более чувствительными такому облучению (H1299DE) или их радиочувствительность не изменилась (H1299S).

Устойчивость выживших после фракционированного облучения клеток A549DE, H1299DE и H1299S и в меньшей мере клеток A549S при независимом от прикрепления росте к тестовому облучению возросла. Пролиферативная активность в сублиниях клеток, полученных после фракционированного облучения, была несколько ниже, чем в исходной линии (A549S и H1299DE) или даже возрастала (H1299S).

Результаты работы, представленные в разделе 3.4 и касающиеся анализа пролиферативной активности клеток НМРЛ, отсортированных по маркерам ОСК CD44 и CD133, и неОСК – клеток с фенотипом CD44<sup>-</sup>/CD133<sup>-</sup>, описаны только качественно без представления количественного анализа, что не позволяет оценить значимые закономерности в их изменении.

При изучении маркеров активации ЭМП и миграции изучаемых клеток НМРЛ и их радиоустойчивых сублиний автор обнаружила снижение уровня экспрессии Е-кадгерина в клетках A549DE и его отсутствие в клетках H1299 и их производных вариантах. Уровень виментина был несколько снижен в сублинии A549S и повышен в сублиниях H1299DE и H1299S по сравнению с исходными родительскими линиями. Уровень N-кадгерина был повышен в обеих сублиниях A549, но снижен в сублинии H1299DE. Изменение указанных показателей сопровождалось снижением миграционной активности клеток A549DE и H1299DE и её увеличением для клеток A549S и H1299S. Различий в уровне экспрессии фактора FRA1 в родительских и выживших после фракционированного облучения клетках A549 и H1299 обнаружено не было.

При изучении экспрессии транскрипционных факторов семейства p53 в клетках исследуемых популяций НМРЛ (в названии раздела 3.7 и в диссертации и в автореферате ошибочно указано «в клетках ГБМ») Л. Алхаддад обнаружила повышение содержания белка p63 в клетках A549S при одновременном снижении уровня белка p73. В клетках H1299DE и H1299S был снижен уровень и p63 и p73.

В сублинии A549DE обнаружено более низкое содержание полиплоидных клеток, чем в родительской линии, а в сублиниях H1299DE и H1299S оно было повышено.

Следует отметить, что полученные Л. Алхаддад резистентные сублинии НМРЛ и в дальнейшем могут быть предметом исследования их радиобиологических и генетических особенностей. В частности, представляет интерес вопрос о присутствии мутаций в гене p53 в полученных из клеток A549 резистентных сублиниях.

Следующая часть работы была посвящена исследованию клеток ГБ. Автором изучена чувствительность к облучению линий ГБ, характеризующихся присутствием мутаций в генах p53 и *PTEN* и разным сочетанием этих генов дикого и мутантного типов по тем же показателям, по которым были исследованы клетки НМРЛ. Исследованы линии U87 (*TAp53wt/PTENmut*), LN229 (*TAp53mut/PTENwt*) и U251 (*GOF p53mut/PTENmut*). Обнаружено увеличение полиплоидных клеток через 24 ч после облучения, наиболее выраженное для клеток LN229 и наименее для линии U251. Эти же линии были более устойчивы к ингибированию пролиферации. В клетках линии U87 обнаружено снижение способности к миграции после облучения. По чувствительности колониеобразования при независимом от прикрепления росте клеток после облучения наиболее радиоустойчивыми были клетки линии U87, затем шли клетки LN229 и наиболее радиочувствительными были клетки линии U251.

Действие излучения существенно не влияло на экспрессию FRA1 в облученных клетках ГБ. Но после облучения в этих линиях не менялась

(LN229) или возрастала (U251, U87) экспрессия p63. Экспрессия p73 возрастала только в клетках линии LN229. После облучения изменялась также экспрессия маркеров, характеризующих активность эпителиально-мезенхимального перехода, но закономерных связей с генотипом ГБ обнаружено не было. Увеличение доли сенесцентных клеток в общей популяции и в популяции полиплоидных клеток (многоядерных гигантских опухолевых клеток) обнаружено только для линии U87.

Полученные Линой Алхаддад результаты подробно обсуждаются в сравнении с опубликованными сведениями в главе «Обсуждение» (20 стр.). Все 5 выводов соответствуют полученным результатам.

Материалы диссертационной работы опубликованы в 6 статьях, из них 4 статьи опубликованы в международных рецензируемых научных журналах первого квартиля (Q1) и 2 статьи в журналах третьего квартиля (Q3), индексируемых в базах данных WoS, Scopus, РИНЦ и в 7 тезисах в материалах профильных конференций, а также апробированы в докладах на отечественных и одной международной конференции.

#### Замечания по работе.

1. Как уже отмечено выше при анализе главы «Материалы и методы», использование МТТ теста для определения активности оксидоредуктаз клеток по изменению оптической плотности представляется не совсем корректным. Снижение оптической плотности определяется не столько изменением активности ферментов, сколько изменением их количества в результате гибели или снижения скорости пролиферации под действием токсических факторов. Поэтому использование МТТ теста для определения активности оксидоредуктаз клеток уместно только тогда, когда количество клеток остается постоянным или при одновременном определении их количества.

2. В главе 3.4 «Пролиферативная активность в изолированных популяциях клеток НМРЛ, имеющих ОСК-маркеры» никак не охарактеризовано содержание выбранных маркеров ОСК в исходных и

отсортированных популяциях, не обоснован выбор критерия для разделения клеток на медленно и активно пролиферирующие клетки, не приведены результаты количественного анализа клеток во фракциях медленно и активно пролиферирующих клеток, как это сделано при анализе клеток глиом разных линий.

3. При анализе радиостойчивости полученных автором сублиний клеток НМРЛ по многим показателям обнаружена разнонаправленная реакция при действии низких и высоких доз (в диапазоне использованных автором доз), что затрудняет оценку эффекта и требует упоминания, о каких дозах идет речь. Возможно, для характеристики радиостойчивости этих сублиний стоило бы определить значения  $D_0$  по кривым зависимости их выживаемости от дозы облучения?

Сделанные замечания не носят принципиального характера и не умаляют достоинство работы.

Диссертация Алхаддад Лины "Клеточно-молекулярные механизмы радиорезистентности немелкоклеточного рака легких и мультиформной глиобластомы человека", выполненная под руководством д.б.н., профессора РАН Осипова Андрея Николаевича и к.б.н. Леонова Сергея Викторовича, и представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.1 – «Радиобиология», является завершенной научной работой.

Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к таким работам. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 1.5.1 – «Радиобиология» (по биологическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова, а также оформлена, согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.



Таким образом, соискатель Алхаддад Лина заслуживает присуждения  
ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.1  
«Радиобиология».

Официальный оппонент:

Москалева Елизавета Юрьевна,  
профессор, доктор биологических наук,  
Зам. руководителя Курчатовского комплекса  
НБИКС-природоподобных технологий по  
научной работе

Федеральное государственное бюджетное  
учреждение Национальный исследовательский  
центр «Курчатовский институт»

Адрес: 123182, Россия, г. Москва, пл.


Академика Курчатова, д. 1

Телефон: 8(916)522-40-54,

Адрес электронной почты: [moskalevaey@mail.ru](mailto:moskalevaey@mail.ru), [Moskaleva\\_EY@nrcki.ru](mailto:Moskaleva_EY@nrcki.ru)

Докторская диссертация защищена  
по специальности 03.00.04 – биохимия

Подпись



12.12.22

Москалева Е.Ю

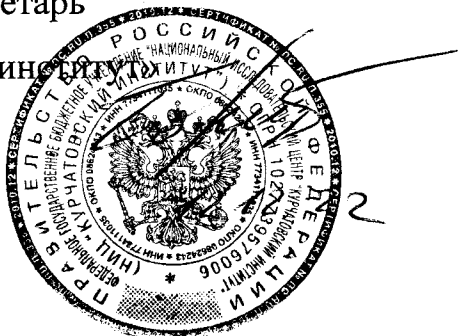
Дата подписания

Подпись сотрудника НИЦ «Курчатовский институт» Москалевой Е.Ю.  
заверяю

Главный ученый секретарь

НИЦ «Курчатовский институт»

Подпись



К.Е. Борисов

Дата подписания