

**ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени
доктора биологических наук Джалиловой Джулии Шавкатовны
на тему: «Клеточные и молекулярно-биологические механизмы
взаимосвязи воспаления, опухолевого процесса и устойчивости к
гипоксии»
по специальности 1.5.22. Клеточная биология**

Актуальность темы выполненной работы

Вопрос о клеточных и молекулярно-генетических механизмах, определяющих различия в устойчивости организмов к действию патогенных факторов, включая гипоксию, является одной из актуальных проблем современной биологии и медицины, так как он связан с проблемой персонализации профилактики и лечения заболеваний. В результате многолетних экспериментальных исследований установлено, что при воздействии сублетальной гипоксической нагрузки в барокамере можно выделить высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии лабораторных животных, которые различаются по многим показателям, в том числе по функциональному состоянию митохондрий, уровню окислительного стресса, активности ферментов антиоксидантной защиты и фактора транскрипции, индуцируемого гипоксией HIF-1 α (Hypoxia-Inducible Factor 1 α).

Роли локальной гипоксии и активации фактора HIF-1 α при развитии опухолей посвящено множество работ. Показано, что локальная гипоксия и активация HIF-1 α коррелирует с агрессивностью опухолевых клеток, темпами прогрессии опухолей, метастазирования и устойчивостью к терапии. Помимо гипоксии, в процессах инициации и прогрессии опухолей важную роль играет воспалительный и иммунный ответы. Установлено, что развитие около 25% случаев злокачественных опухолей связано с хроническим воспалением, однако механизмы этой взаимосвязи недостаточно изучены. В этой связи несомненную актуальность имеют исследования особенностей развития и коррекции воспалительной реакции на фоне опухолевой прогрессии в зависимости от индивидуальной устойчивости организма к гипоксии.

В мировой литературе в настоящее время отсутствуют данные о клеточных и молекулярно-биологических механизмах взаимосвязи между исходной устойчивостью организма к гипоксии, воспалением и процессами инициации и прогрессии опухолей. Исследование клеточных и молекулярных механизмов взаимосвязи устойчивости к гипоксии, воспаления и опухолевого процесса позволит определить новые мишени для терапии опухолевых заболеваний и разработать неинвазивные способы определения устойчивости к недостатку кислорода, что необходимо для создания новых оригинальных и более эффективных методов лечения злокачественных опухолей.

Цель работы Джалиловой Д.Ш. – установить клеточные и молекулярно-биологические механизмы взаимосвязи исходной устойчивости к гипоксии, воспаления, инициации и прогрессии опухолей. Поставленные автором задачи диссертационного исследования адекватны для достижения намеченной цели.

Актуальность работы не вызывает сомнений в виду того, что гипоксия часто выступает как первопричина многих патофизиологических процессов, связанных с нарушениями деятельности сердечно-сосудистой и дыхательной систем, метаболическими и иммунными нарушениями. Само по себе исследование гипоксии в опухолях является актуальной тематикой современных работ, однако автор рассматривает ее с новой точки зрения. Тема взаимосвязи исходной устойчивости организма к гипоксии, воспаления и процессов онкогенеза является оригинальной, подобные исследования в литературе отсутствуют.

Новизна положений и выводов, сформулированных в диссертации

В работе впервые установлено, что среди самцов крыс Вистар разных возрастных групп наименее устойчивыми к гипоксии являются препубертатные животные, у которых выявлено низкое содержание HIF-1 α в сыворотке крови. Низкий уровень экспрессии гена *Hif1a* у половозрелых крыс при высоком содержании белка HIF-1 α сочетается с низким содержанием белка PND2 в печени. Повышение содержания белка HIF-1 α в печени и

сыворотке крови у половозрелых крыс сопровождается увеличением содержания АФК и провоспалительных цитокинов TNF- α и IFN- γ . У высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии старых животных различия уровней экспрессии генов *Hif1a*, *Nfkb* и *Vegf* в печени не выражены, поэтому оптимальным возрастным периодом для исследования является половозрелый, в котором различия исходной устойчивости к гипоксии наиболее выражены.

Автором впервые показано, что у низкоустойчивых к гипоксии мышей течение острого язвенного колита более тяжелое и характеризуется развитием транзиторного вторичного иммунодефицита. Течение хронического язвенного колита также более тяжелое у низкоустойчивых к гипоксии животных и сопровождается развитием компенсированного вторичного иммунодефицита.

Установлено, что темпы инициации и прогрессии опухолей зависят от исходной устойчивости организма к гипоксии. У низкоустойчивых к недостатку кислорода животных в опухолях при колит-ассоциированном KPP по сравнению с высокоустойчивыми наблюдается более высокая экспрессия генов, регулирующих ответ на гипоксию – *Hif1a* и *Vegf*, воспаление – *Tnfa*, *Il6*, *Il10* и *Tgfb*, клеточный цикл и апоптоз – *Cmet*, *Egf*, *Egfr*, *Bax*, и генов, кодирующих компоненты эпителиального барьера – *Muc1* и *Cldn7*. Темпы инициации и прогрессии колоректального рака, развивающегося на фоне хронического воспаления у низкоустойчивых к гипоксии животных выше, что сопровождается более выраженными иммунными нарушениями и системным воспалительным ответом.

На моделях глиобластомы 101.8 и карциномы легких показано, что прогрессия опухолей у низкоустойчивых к гипоксии животных сопровождается развитием выраженного системного воспалительного ответа с повышением содержания провоспалительных цитокинов IL-1 β и TNF- α в сыворотке крови, уровней экспрессии *Hif1a*, *Nfkb*, *Tnfa* в печени, нейтрофильно-лимфоцитарного индекса NLR и индекса системного воспалительного ответа SIRI.

Впервые показано, что низкоустойчивые к гипоксии животные характеризуются провоспалительным фенотипом. По сравнению с низкоустойчивыми у высокоустойчивых животных в неактивированных макрофагах выше экспрессия гена и содержание белка VEGF, а у низкоустойчивых к гипоксии крыс статистически значимо выше экспрессия генов провоспалительных цитокинов *Il1b* и *Tnfa* и гена *Eras1* (*Hif2a*). На активацию липополисахаридом макрофаги низкоустойчивых к гипоксии животных реагируют увеличением экспрессии *Hif1a*, содержания белка HIF-1 α , HGF и хемокинового рецептора CCR7. Установлено, что воздействие в барокамере на критической «высоте» вызывает изменение *ex vivo* продукции IL-1 β и IL-10, которое сохраняется через один месяц после определения устойчивости к гипоксии.

В представленной работе дан ответ на важный методический вопрос – возможно ли определение устойчивости к гипоксии без помещения в барокамеру и воздействия кислородной недостаточности. Автором выявлены биомаркеры устойчивости к недостатку кислорода без гипоксического воздействия на организм – после инкубации клеток крови *ex vivo* в течение 24 ч только у низкоустойчивых к гипоксии крыс обнаружена высокая спонтанная продукция IL-10, TNF- α и IL-6. После стимуляции клеток крови комплексным митогеном – ЛПС, ФГА и КонА, продукция IL-1 β увеличивается только у низкоустойчивых к гипоксии крыс. Эти результаты послужили основой двух патентов на изобретения.

Степень обоснованности и достоверности положений, выносимых на защиту, научных выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Диссертационная работа выполнена на достаточном для получения обоснованных выводов количестве животных – 247 самцах крыс Вистар и 234 самцах мышей C57Bl/6, т.е. итоговое число животных, включенных в исследования, составило 481. В экспериментах использованы широко распространенные, релевантные, высоко воспроизводимые модели опухолей.

Применен комплекс традиционных и современных методов исследования, таких как гистологические, морфометрические, биохимические и культуральные методы, проточная цитофлуориметрия, иммуноферментный анализ, ПЦР в режиме реального времени, Вестерн-блоттинг. Проведен адекватный статистический анализ. Выводы соответствуют полученным результатам и являются достоверными.

Прежде чем приступить непосредственно к достижению цели работы, автор закономерно ставит вопрос о том, какого возраста должны быть животные для моделирования опухолевого процесса во взаимосвязи с индивидуальной устойчивостью к гипоксии. Известно, что устойчивость к гипоксии может изменяться с возрастом, а наиболее устойчивыми к недостатку кислорода являются новорожденные организмы. Однако данные об изменениях активности HIF с возрастом противоречивы. В экспериментальных исследованиях после определения индивидуальной устойчивости к гипоксии в барокамере выявлены различия между высокоустойчивыми и низкоустойчивыми половозрелыми животными, однако неизвестно, разделяются ли на высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии животные других возрастных периодов. Для ответа на эти вопросы автором был проведен значительный объем работы, в результате которого выбрана группа половозрелых животных, в которой различия в экспрессии изученных генов – *Hif1a*, *Nfkb* и *Vegf* между высокоустойчивыми и низкоустойчивыми крысами наиболее выражены.

По результатам работы Джалиловой Д.Ш. на трех опухолевых моделях выявлена зависимость темпов инициации и прогрессии опухолей от индивидуальной устойчивости к гипоксии и тяжести ассоциированного с опухолевой прогрессией системного воспалительного ответа. В исследуемых группах проведено морфологическое и морфометрическое исследования, анализ уровня экспрессии генов, продукции про- и противовоспалительных цитокинов, субпопуляционного состава лимфоцитов, а также используются другие подходы для всестороннего изучения опухолевой прогрессии и

связанного с ней системного воспалительного ответа, и реакций иммунной системы. Такой комплексный анализ позволил заключить, что у низкоустойчивых к гипоксии крыс и мышей темпы инициации и прогрессии опухолей выше, а онкогенез сопровождается более выраженным системным воспалительным ответом по сравнению с высокоустойчивыми животными. Результаты работы изложены логично, их достоверность не вызывает сомнений. Автором использованы корректные статистические методы.

Значимость для науки и практической медицины полученных автором результатов

Автор отмечает, что существующие способы оценки исходной устойчивости организма к гипоксии предполагают непосредственное воздействие на организм условий гипоксии, т.е. *in vivo*. При таких способах оценки у животных, как правило, используется сублетальная гипоксическая нагрузка, которая может приводить к воспалительным изменениям во внутренних органах. В последние десятилетия увеличивается популярность основанной на повышении устойчивости к недостатку кислорода гипокситерапии для профилактики обострения многих заболеваний, их лечения и реабилитации пациентов. Однако до сих пор не разработаны доступные и информативные способы определения индивидуальной устойчивости к гипоксии у человека, позволяющие прогнозировать терапевтическую эффективность гипокситерапии, а также неблагоприятные реакции организма на гипоксию. Поэтому актуальной задачей является разработка способов определения устойчивости организма к гипоксии, основанных на использовании чувствительных лабораторных биомаркеров.

Автором предложен новый метод определения устойчивости животных к гипоксии на основе оценки продукции цитокинов клетками крови *ex vivo*: у низкоустойчивых к гипоксии крыс выявлена высокая спонтанная продукция IL-6, IL-10 и TNF- α , а также митоген-стимулированная активация продукции IL-1 β . Экстраполяция этих экспериментальных данных на человека позволит оценивать устойчивость к гипоксии без ее системного воздействия на

организм и на основании результатов стратифицировать пациентов по устойчивости к недостатку кислорода. Это необходимо для решения ряда важнейших проблем: персонализации профилактики и лечения опухолевых заболеваний, а также инфекционных и воспалительных осложнений при хирургических операциях, сопровождающихся гипоксией.

Таким образом, полученные автором приоритетные результаты расширяют представления о фундаментальных клеточных и молекулярно-биологических основах взаимосвязи устойчивости к гипоксии, воспаления и онкогенеза, а также имеют прикладное значение.

Результаты диссертационного исследования вносят существенный вклад в понимание молекулярно-биологических механизмов взаимосвязи гипоксии, воспаления и онкогенеза. Полученные данные обосновывают сроки проведения экспериментальных исследований на животных после определения устойчивости к гипоксии, а также вносят значительный вклад в понимание роли индивидуальной устойчивости к гипоксии в развитии опухолей и связанного с ними воспаления, и свидетельствуют о необходимости определения групп риска перед применением ингибиторов HIF. В перспективе комбинированное применение ингибиторов HIF с хирургическими и медикаментозными подходами у пациентов с учетом их индивидуальной устойчивости к гипоксии позволит улучшить эффективность лечения опухолевых заболеваний. Важным методическим аспектом работы является разработка способа определения устойчивости организма к гипоксии без воздействия в барокамере.

Данные о структурных и молекулярно-биологических различиях в норме и при остром и хроническом язвенном колите, колоректальном раке, глиобластоме и карциноме легких у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии животных являются доказательной базой для разработки новых персонализированных подходов к профилактике и лечению воспалительных и онкологических заболеваний человека.

Личный вклад автора заключался в планировании и проведении экспериментов, определении устойчивости животных к гипоксии, моделировании колоректального рака, глиобластомы и карциномы легких у животных с разной устойчивостью к гипоксии, исследовании молекулярно-биологических особенностей макрофагов и продукции цитокинов клетками крови у животных с разной устойчивостью к гипоксии, анализе результатов и их адекватной статистической обработке, а также обобщении и сравнении их с данными современной литературы, подготовке публикаций.

Диссертационное исследование построено логично, работа написана по классическому плану на 512 страницах, состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и их обсуждение, общее обсуждение, заключение, выводы, список литературы и приложения.

Обзор литературы дает полное представление о современном состоянии исследуемой проблемы и раскрывает вопросы, не нашедшие разрешения на сегодняшний день, что позволило автору обосновать цель и задачи исследования. В своей работе Джалилова Д.Ш. подробно рассматривает современное состояние проблемы, а именно устойчивость организма к гипоксии как один из факторов, определяющих особенности инициации и прогрессии опухолей и течения воспалительных и иммунных реакций на фоне опухолевой прогрессии. В разделе «Обзор литературы» автор рассматривает ключевые механизмы онкогенеза, особенности воспалительных и иммунных реакций при развитии опухолей, а также основные молекулярные пути, реализующие реакцию клеток на гипоксию. Подробно рассмотрены новые возможности терапии опухолей, основанные на коррекции внутриопухолевой гипоксии. Далее Джалилова Д.Ш. приводит молекулярно-биологические особенности организмов с разной устойчивостью к гипоксии и способы ее определения, факторы, влияющие на устойчивость. Обзор литературы написан хорошим научным языком, содержит обобщенные актуальные данные мировой науки в исследуемой области.

Раздел «Материалы и методы» написан подробно, с перечислением всех методик, используемых в работе. Методики выбраны в полном соответствии современному уровню развития технологий и поставленным в работе задачам.

Полученные автором результаты изложены последовательно, хорошим литературным языком. Диссертационный материал содержит 99 таблиц, иллюстрирован информативными микрофотографиями высокого качества, 176 рисунками и диаграммами, а также наглядными схемами. Весь материал диссертационной работы хорошо иллюстрирован, что существенно облегчает ее восприятие.

В каждом разделе работы детально обсуждаются полученные результаты с привлечением современной литературы, список которой включает 1163 российских и иностранных источника. Такое большое количество связано с тем, что затрагиваются фундаментальные проблемы возрастной устойчивости к недостатку кислорода, онкогенеза, гипоксии и воспаления. В работе, кроме заключения и обсуждения результатов каждого раздела, есть общее обсуждение и заключение, в которых полученные автором результаты анализируются во взаимосвязи друг с другом и литературными данными. Работа обладает внутренним единством, содержит новые научные результаты и достоверные положения, выносимые на защиту, написана аргументировано, логично, хорошим литературным языком. Поставленные задачи решены.

В автореферате и опубликованных работах отражены основные положения диссертации. По материалам работы опубликовано 24 печатных работы в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ им. М.В. Ломоносова по специальности 1.5.22. Клеточная биология, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук и ученой степени доктора наук. Качество публикаций определяется тем, что из 24 публикаций все 24 индексируются в RSCI, из них 9 – Q1 и Q2 WoS.

Получено 2 патента РФ на изобретения. Сделано 50 устных и стендовых докладов на Всероссийских и Международных конференциях.

Работа была поддержана несколькими грантами, а именно грантом Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук МК-2573.2022.1.4, грантом Российского научного фонда №23-25-00294, грантом Фонда содействия инновациям УМНИК-2022 18539ГУ/2023. За доклады по основным результатам работы на различных конференциях автором получены дипломы II степени на секции молодых ученых, диплом Победителя конкурса молодых ученых (I место) в секции «Клеточная биология и регенеративная медицина» и диплом III степени в конкурсе стендовых докладов, диплом Победителя конкурса молодых ученых (II место) в конкурсе стендовых докладов.

Выводы, сформулированные в работе, основаны на большом фактическом материале и полностью отражают результаты, полученные лично автором. Есть все основания признать работу завершенной. Замечаний, влияющих на положительную оценку работы Д.Ш. Джалиловой, нет. При ознакомлении с диссертационной работой возникли вопросы дискуссионного характера:

1. Какой может быть потенциальный механизм противоопухолевой эффективности при воздействии интервальной гипоксии/гипероксии?
2. Есть ли примеры у других видов организмов, когда при исходной высокой устойчивости к гипоксии наблюдается повышенная онкорезистентность?
3. С учетом того, что повышение экспрессии HIF-1 α стимулирует опухолевую прогрессию, целесообразно ли считать наличие онкозаболеваний противопоказанием к проведению гипокситерапии?

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации

соответствует специальности 1.5.22. Клеточная биология (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. Диссертационное исследование оформлено согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Джалилова Джулия Шавкатовна заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.22. Клеточная биология.

Официальный оппонент:

доктор медицинских наук,
профессор кафедры патологической физиологии
Федерального государственного автономного образовательного учреждения
высшего образования Первый Московский государственный медицинский
университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения
Российской Федерации (Сеченовский Университет)

Трегуб Павел Павлович

Контактные данные:

тел.: +7 (499) 248-53-83, e-mail: tregub_p_p@staff.sechenov.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация:
3.3.3. Патологическая физиология (медицинские науки)

Адрес места работы:

119048, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2,
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования Первый Московский государственный медицинский
университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения
Российской Федерации (Сеченовский Университет), кафедра патологической
физиологии, Тел.: 8(499)248-53-83; e-mail: tregub_p_p@staff.sechenov.ru

Подпись сотрудника П.П. Трегуба удостоверяю:

