

ОТЗЫВ

официального оппонента Ульянова Сергея Владимировича
на диссертацию на соискание ученой степени
кандидата биологических наук Шнайдер Полины Владимировны
на тему: “Исследование вклада межклеточной коммуникации в
возникновение резистентности злокачественных опухолей яичника к
противоопухолевым препаратам”
по специальности 1.5.4. Биохимия

Актуальность темы исследования

Диссертационная работа Полины Владимировны Шнайдер посвящена одной из ключевых проблем современной онкологии — приобретению устойчивости опухолевыми клетками к противоопухолевой терапии. Эта тема интересна как с точки зрения фундаментальных исследований, так и с практической точки зрения. Химиорезистентность является основной причиной низкой эффективности лечения большинства злокачественных опухолей, включая аденокарциному яичников, известную своей высокой смертностью и высокой частотой рецидивов.

Асцитные жидкости пациентов с аденокарциномой яичников представляют собой уникальный резервуар для опухолевых клеток и секретируемых ими молекул. Использованная в исследовании коллекция асцитных жидкостей от пациентов до и после химиотерапии позволила получить информацию о процессах, происходящих в организме пациента в ходе химиотерапии. При этом сходимость результатов, полученных в экспериментах с асцитными жидкостями и секретами, сгенерированными в условиях *in vitro*, усиливает достоверность полученных результатов и построенных на них выводов.

Данная работа объединяет в себе изучение процессов, происходящих как в донорных клетках и их секретах, так и в реципиентных клетках, получивших сигнал от погибающих клеток. Все это создает общее представление о механизме приобретения химиорезистентности в ходе межклеточной коммуникации,

опосредованной химиотерапией. Работа автора является одной из первых в данном направлении, и задает вектор для последующих исследований.

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

Положения, выносимые автором на защиту логично вытекают из результатов проведенных экспериментов. Ключевые выводы работы подтверждаются не только на уровне биологических повторностей, но и на уровне разнообразия используемых методик.

Научная новизна и значимость исследования

Научная новизна исследования заключается в изучении процесса межклеточной коммуникации именно в условиях, близких к химиотерапевтическим. Подавляющее большинство уже существующих работ, посвященных исследованию коммуникации опухолевых клеток и/или клеток микроокружения, сосредоточены на моделировании процессов в “комфортных” для опухолевых клеток условиях – что и является их основным недостатком, так как в организме пациента опухолевые клетки постоянно сталкиваются с различного рода стрессами, включая химиотерапевтический. Как показала работа Шнайдер Полины Владимировны, химиотерапия значительно изменяет профили секреции опухолевых клеток, что в дальнейшем и приводит к формированию химиорезистентности. Также стоит отметить тщательно проработанный и при этом весьма простой протокол генерации секретомов. Данная методика может быть использована не только в исследованиях, посвященных биологии опухолевой клетки, но и в других направлениях молекулярной и клеточной биологии.

Степень достоверности результатов

Достоверность результатов обеспечивается использованием широкого спектра современных методов, а также проведением экспериментов в нескольких

повторностях. Приведенные результаты были опубликованы в авторитетных рецензируемых международных журналах, что дополнительно подтверждает их достоверность.

Оценка структуры, содержания и оформления диссертации

Диссертационная работа представлена на 115 страницах и включает следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и их обсуждение, заключение, выводы и список литературы. Работа содержит 44 иллюстрации, 5 таблиц и включает 290 литературных источников.

В разделе «Обзор литературы» автор рассматривает современные исследования, посвящённые процессам, происходящим в опухолевой клетке в ответ на химиотерапию и способствующим формированию химиорезистентности. Отдельное внимание уделено описанию работ, изучающих межклеточную коммуникацию опухолевых клеток как в нормальных условиях, так и в условиях стресса. Кроме того, в разделе представлена информация о модельном объекте исследования — аденокарциноме яичников, с акцентом на состав и особенности асцитной жидкости.

В разделе «Результаты и обсуждение» автор демонстрирует явление приобретённой химиорезистентности на примере асцитных жидкостей от пациенток с аденокарциномой яичников и первичных культурах опухолевых клеток, полученных из этих жидкостей. Далее автор переходит к моделированию процесса химиотерапии *in vitro*. На первом этапе был проведён подбор условий для генерации секретомов от погибающих и контрольных клеток, а также их характеристика. Так, например, было показано, что секретомы от погибающих клеток содержат более высокую концентрацию внеклеточных везикул и достигают максимального биологического эффекта при концентрировании для инкубации с реципиентными клетками в 8 раз. Несмотря на то, что сила биологического эффекта обладает концентрационной зависимостью, автор показал, что состав внеклеточных везикул не менее важен — секретомы от контрольных клеток сконцентрированные до уровня секретомов от погибающих

клеток не обладали тем же хемопротективным эффектом. Далее была оценена длительность эффекта секретомов, и установлено, что: i) химиорезистентность сохраняется только при постоянном присутствии сигнальных молекул от погибающих клеток в окружающей среде; ii) эффект не ослабевает и не усиливается при более длительной инкубации с секретомом. На примере белков сплайсосомы автор продемонстрировал инкапсуляцию эффекторных сигнальных молекул во внеклеточные везикулы. Следующим шагом в изучении эффектов секретомов от погибающих клеток была оценка способности нормальных клеток приобретать устойчивость к химиотерапии как результат межклеточной коммуникации. Автор показал, что только опухолевые клетки способны как секретировать эффекторные сигнальные молекулы, так и отвечать на них активацией сигнальных путей, способствующих формированию устойчивости к химиотерапии. На завершающем этапе диссертационной работы Шнайдер Полина Владимировна показала, что инкубация реципиентных клеток с секретомами от погибающих клеток повышают эффективность репарации ДНК, подготавливая опухолевые клетки к последующему терапевтическому воздействию.

Хотелось бы отметить высокое качество иллюстраций и исключительную аккуратность в оформлении работы и представлении результатов.

Тем не менее, по прочтении работы могу высказать следующие замечания и вопросы:

1. Некоторые выводы следовало бы формулировать осторожнее. Так, на странице 56 читаем: *«Таким образом, мы показали, что химиотерапия приводит к формированию более химиорезистентной популяции опухолевых клеток»*. В контексте излагаемого материала это выглядит так, как будто автор открыл феномен возникновения устойчивости раковых клеток к химиотерапии.

2. Рисунок 9 (и аналогичные): было бы полезно указать, сколько генов попадают в каждую категорию, а также привести аналогичный анализ для генов, снизивших уровень транскрипции. Воспроизводились ли результаты GSEA у разных пациентов?

3. На странице 61 читаем: *«Полученные результаты описывают изменения, произошедшие в популяции опухолевых клеток после нескольких курсов химиотерапии, то есть через несколько месяцев после начала лечения. Таким образом, при интерпретации данных стоит учитывать, что в таком случае оценивается не только влияние прямого стрессового воздействия, вызывающего изменения в межклеточной коммуникации опухолевых клеток, но и влияние клональной селекции»*. Можно ли хотя бы приблизительно оценить относительный вклад клональной селекции и прочих факторов в клеточный фенотип после нескольких месяцев лечения? На чём основана уверенность автора в том, что вообще какие бы то ни было факторы, кроме клональной селекции, стоит брать в расчёт при интерпретации данных, полученных в подобных экспериментах?

4. Значимо ли перекрываются множества дифференциально экспрессируемых генов, выявленных при сравнении клеток из асцитных жидкостей пациентов до и после химиотерапии, и при сравнении клеток от пациентов до ХТ до и после обработки аутологичной асцитной жидкостью?

5. В методах описано, что при подготовке секретомов использовали фильтрацию на картриджах Amicon 100 kDa. Это означает, что сигнальные молекулы относительно малого размера (такие как интерлейкины, TNF-альфа и прочие) не попадали в финальный препарат секрета. Не ясно, с чем связана такая избирательность при подготовке образцов.

Указанные замечания ни в коей мере не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 1.5.4. Биохимия (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 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 Шнайдер Полина Владимировна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

Официальный оппонент:

доктор биологических наук
ведущий научный сотрудник
лаборатории структурно-функциональной организации хромосом
Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института
биологии гена Российской академии наук (ИБГ РАН)

Ульянов Сергей Владимирович

подпись

Контактные данные:

тел.: 8(499)135-97-87, e-mail:

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация: 1.5.3. Молекулярная биология (биол. науки)

Адрес места работы:

119334, г. Москва, ул. Вавилова, д. 34/5

Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института
биологии гена Российской академии наук (ИБГ РАН)

Тел.: 8(499)135-97-87, e-mail:

Подпись Ульянова С.В. заверяю

Ученый секретарь ИБГ РАН

Дата

д.б.н. Набирочкина Е.Н.