

## ОТЗЫВ

### официального оппонента

кандидата биологических наук Даниловой Анны Борисовны на диссертацию Киселевой Любови Николаевны «Исследование действия облучения и фотемустина на выживаемость и популяционный состав клеточных линий глиобластом человека», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 Клеточная биология, цитология, гистология

### Актуальность темы выполненного исследования

В структуре заболеваемости злокачественными новообразованиями населения Российской Федерации удельный вес опухолей головного мозга и других отделов нервной системы у всех заболевших в возрасте до 30 лет составляет 9,6%, а прирост заболеваемости за последние 10 лет – 19,67%, согласно данным Каприна А.Д. и соавт. (2021).

Глиобластома является наиболее часто встречающейся злокачественной опухолью головного мозга с преимущественно астроцитарной дифференцировкой и характеризуется крайне неблагоприятным прогнозом. Несмотря на совершенствование методов диагностики, хирургического лечения, химио- и радиотерапии глиобластом, медиана общей выживаемости составляет около 15 мес. (от 12 до 17,1 мес). Согласно данным Яковленко Ю.Д. (2019) количество больных с глиобластомой, переживших 3 года, составляет не более 15 % (от 2,2 до 21 %), а 5 лет — до 5 % пациентов. Остается нерешенной проблема возникновения рецидивов после проведения стандартной терапии, когда в значительном числе случаев рецидивирующая опухоль демонстрирует более высокую резистентность к терапии, чем исходные глиобластомы. Существующее положение вещей диктует необходимость разработки инновационных подходов для определения новых терапевтических стратегий, которая должна базироваться на современных исследованиях свойств клеток глиобластом. Одним из этих направлений



является изучение биологических особенностей опухолевого процесса при глиобластомах, и здесь на первый план выступают исследования *in vitro* на культурах малигнизированных клеток, полученных из фрагментов интраоперационных тканей опухоли пациентов. Использование культивируемых клеток глиобластом дает возможность создавать модельные системы, позволяющие изучать специализированные свойства клеток в строго контролируемых условиях окружающей среды без влияния интегрирующих стимулов целостного организма, проводить исследования на идентичном материале, длительно наблюдать опухолевые клетки, подвергшиеся воздействию тех или иных терапевтических средств, в том числе для поиска возможностей предотвращения развития рецидивов в клинической практике.

Таким образом, данная диссертационная работа, целью которой явилась оценка действия облучения и препарата фотемустин на выживаемость и популяционный состав клеток культивируемых линий глиобластом, а также на активность в них генов факторов, влияющих на прогрессию опухолей, представляет собой крайне своевременное и актуальное исследование.

### **Научная новизна исследования**

Научная новизна диссертационной работы не вызывает сомнений и обоснована тем, что получены новые данные о существовании двух вариантов реакции клеточных линий глиобластомы на действие генотоксических факторов в зависимости от присутствия нейрональных маркеров CD56 и CD133. Обнаружено, что под воздействием препарата фотемустин и ионизирующего излучения происходит модуляция экспрессии генов факторов, ассоциированных с прогрессией опухолей *HGF*, *TNC*, *TGFβ1*, *FAP*, что сопровождается появлением субпопуляции морфологически измененных клеток.

### **Теоретическая и практическая значимость исследования**

Результаты, полученные в ходе выполнения диссертационной работы Киселевой Л.Н., носят как фундаментальный, так и прикладной характер. В работе были охарактеризованы две новые клеточные линии глиобластом R1 и T2, выделенные из опухолей пациентов с подтвержденным диагнозом «глиобластома», которые можно использовать в качестве модельных объектов в дальнейших исследованиях. Нейрональные маркеры CD56 и CD133 могут рассматриваться как потенциальные маркеры прогноза ответа опухоли на действие радио- и химиотерапии, так как культивируемые клетки глиобластомы, неэкспрессирующие данные маркеры, демонстрируют резистентность к терапевтическим воздействиям. Данные, полученные в результате проведенной работы, вносят теоретический вклад в понимание биологии опухолей ЦНС.

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

Достоверность и обоснованность полученных результатов обеспечена тщательной теоретической проработкой проблемы, достаточным объемом изученного материала, применением комплекса современных методов исследования, использованием современных статистических методов обработки для анализа полученных результатов. Автором лично проведено культивирование клеток глиобластомы, все экспериментальные части работы, морфологические исследования, проточная цитометрия, анализ данных молекулярно-генетических исследований.

Поставленные диссертантом цель и задачи исследования соответствуют названию работы и её содержанию. Выносимые на защиту положения аргументированы и логично вытекают из материалов диссертации. Выводы диссертационной работы логически обоснованы и полностью соответствуют поставленным задачам и полученным результатам.

#### **Рекомендации по использованию результатов диссертации**

Результаты диссертационного исследования, связанные с выявлением различной реакции культивируемых клеток глиобластом на терапевтические воздействия, ассоциированные с экспрессией нейрональных маркеров CD56 и CD133 и транскрипционной активностью ряда генов ростовых факторов, белков внеклеточного матрикса, а также генов белков, связанных с мезенхимным фенотипом, расширяют представления об адаптационных возможностях и пластичности клеток злокачественных новообразований и могут дополнить сведения, включенные в образовательные программы высших учебных учреждений соответствующего профиля. Данные, полученные в диссертационной работе, могут быть использованы при разработке новых стратегий в терапии злокачественных новообразований и служить базой для предклинических испытаний на животных моделях.

### **Оценка структуры и содержания работы**

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, главы «Материалы и методы», где описаны применяемые автором методики, главы по результатам собственных исследований, обсуждения полученных результатов, заключения, выводов, списка сокращений, списка использованной литературы и приложения, где представлены конкретные данные по экспрессии изучаемых генов.

Библиографический указатель включает 151 источник, 70,1% из них опубликованы в течение последних 5 лет. Объем диссертации – 106 стр., текст проиллюстрирован 19 рисунками и 18 таблицами.

**Во введении** автор определяет актуальность исследования, степень разработанности темы, формулирует цель и задачи, методологию и методы исследования, научную новизну, теоретическую и практическую значимость, определяет степень достоверности диссертационной работы, представляет апробацию результатов и положения, выносимые на защиту.

**В главе 1 (обзор литературы)** автор подробно останавливается на описании гистологического происхождения и классификация глиом, в том

числе морфологических особенностей, иммунофенотипа, характеристики популяции клеток, подобных стволовым. Автор обсуждает также имеющиеся в мировой и отечественной литературе данные о роли некоторых факторов в прогрессии глиобластом, в частности, опухолевого микроокружения, способности к эпителиально-мезенхимальному переходу, критериев гетерогенности глиобластом. В обзоре литературы хорошо представлены сведения о клеточных моделях, которые были разработаны для изучения этого вида злокачественного новообразования. Обзор литературы занимает 25 стр., литературные данные описаны хорошим языком и позволяют определить место и значение предпринятого исследования в системе существующих научных положений.

**В главе 2 «Материалы и методы»** (10 стр.) находится описание материала исследования и подробно охарактеризованы методы, которые автор использовал в своей диссертационной работе. В исследование были включены культуры клеток глиобластомы, как постоянные клеточные линии, так и выделенные непосредственно из опухолевого материала человека. Автор использовал в своей работе метод культивирования клеток, световой микроскопии, иммуноцитохимии, проточной иммуно- и ДНК-цитометрии, полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Все избранные методы исследования и статистического анализа результатов адекватны поставленным задачам.

**В главе 3 «Результаты»** (24 стр.) автор представляет морфологическую и иммуноцитохимическую характеристику клеток линий глиобластом, где выявляет клеточную гетерогенность полученных культур. При характеристике поверхностных маркеров автор обнаруживает, что все клеточные линии экспрессировали мезенхимальные маркеры, а две клеточные линии из четырех характеризовались значительной экспрессией нейрональных маркеров CD56 и CD133/2. Во всех клеточных линиях была отмечена высокая транскрипционная активность генов ростовых факторов *TGFβ1*, *VEGF*, *FGF2(b)*, и низкая активность гена *EGF*. Далее автор

представляет данные по различной чувствительности клеточных линий глиобластом по отношению к действию таких генотоксических факторов, как облучение и химиотерапевтический агент фотемустин. В культурах, резистентных к моделируемым терапевтическим воздействиям в сублетальных дозах, автор выявляет появление крупных одноядерных и многоядерных клеток, которые сохраняли жизнеспособность в течение периода наблюдения. Радио- и химиорезистентность оказалась ассоциирована с изменением соотношения клеточных супопуляций в изучаемых клеточных линиях глиобластом и с увеличением транскрипционной активности генов фактора роста гепатоцитов, белка внеклеточного матрикса тенасцина С и белка активированных фибробластов, играющих роль в опухолевой прогрессии.

В главе «Обсуждение», занимающей 8 стр., имеет место лаконичный, но емкий сравнительный анализ совокупности данных, имеющихся в мировой и отечественной литературе, и результатов, полученных автором диссертационного исследования, что дает основания для формирования полноценных выводов. Рукопись диссертации заканчивается заключением, где автор акцентирует внимание на тех положениях диссертационной работы, которые открывают новые области исследований глиобластом.

**Выводы** хорошо обоснованы полученными данными и соответствуют поставленной цели и задачам.

Материалы диссертации полностью отражены в автореферате и в достаточном количестве опубликованных работ (девять публикаций, в том числе четыре статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки России для размещения материалов кандидатских диссертаций). Основные результаты автор докладывал на пяти научных отечественных и международных конференциях.

Принципиальных замечаний по существу и оформлению работы нет.

В плане научной дискуссии хотелось бы задать несколько вопросов:

1. По какой причине среди спектра химиопрепаратов, применяемых для лечения глиобластомы, выбран фотемустин для анализа в модельной системе?
2. Как соотносятся дозы фотемустина и фотонного излучения, использованные в эксперименте, с применяемыми в реальной клинической практике?
3. Согласно клиническим рекомендациям по лечению первичных опухолей центральной нервной системы, утвержденным Ассоциацией нейрохирургов России, режимы лечения на основе нитрозопроизводных (в монотерапии – фотемустин и пр.) рекомендованы для использования у больных с анапластической астроцитомой, анапластической олигодендроглиомой, анапластической олигоастроцитомой в качестве химиотерапии после удаления опухоли и лучевой терапии. Проводились ли исследования сочетанного действия радиотерапии и препарата фотемустин на культурах клеток глиобластомы?
4. Как возможно охарактеризовать в целом обнаруженные Вами феномены изменения фенотипа клеток глиобластомы и транскрипционной активности ряда генов под воздействием цитотоксических факторов?

### **Заключение**

Диссертационная работа Киселевой Любови Николаевны «Исследование действия облучения и фотемустина на выживаемость и популяционный состав клеточных линий глиобластом человека», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, является завершенной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной задачи, направленной на выявление ранее неизвестных биологических закономерностей прогрессии глиобластом под влиянием терапии путем воздействия на клетки генотоксическими факторами в модельной системе *in vitro*.

Современный дизайн исследования, адекватные подходы и методы его исполнения, достаточный объем полученных данных, их научная трактовка,

использование статистических методов обработки, а также актуальность и новизна исследования позволяют заключить, что диссертационная работа Киселевой Л.Н. полностью соответствует требованиям п.п.9-14 «Положения ВАК МО РФ о порядке присуждения ученых степеней», утвержденным Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. №842 (в редакции Постановлений Правительства РФ от 21.04.2016 № 335, от 02.08.2016 № 748, от 29.05.2017 № 650, от 28.08.2017 № 1024, от 01.10.2018 № 1168, от 11.09.2021 № 1539), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор Киселева Любовь Николаевна заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 Клеточная биология, цитология, гистология.

#### Официальный оппонент

Старший научный сотрудник Научного отдела  
онкоиммунологии Федерального  
государственного бюджетного учреждения  
«Национальный медицинский  
исследовательский центр онкологии имени Н.Н.  
Петрова» Министерства здравоохранения  
Российской Федерации,  
кандидат биологических наук по специальности  
14.00.14 – Онкология (биологические науки)



А.Б. Данилова

21.07.2022

Подпись

ученый секретарь



Даниловой А.Б. заверяю

Иванцов

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации  
Адрес организации: Россия, 197758, Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, д.68  
тел. : (812) 439-9566, эл.адрес oncl@rion.spb.ru