

«УТВЕРЖДАЮ»

Проректор по научной работе

ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский

государственный медицинский университет

им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России,

академик РАН, д.м.н., профессор

Ю.С. Полушин

2022 года



ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

о научно-практической значимости диссертационной работы Киселевой Любови Николаевны «Исследование действия облучения и фотемустина на выживаемость и популяционный состав клеточных линий глиобластом человека», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Актуальность темы исследования

Глиобластомы – одни из самых распространенных опухолей головного мозга человека, которые до настоящего времени не излечимы. После проведения стандартной комплексной терапии, включающей хирургическое удаление опухоли, лучевую и химиотерапию, возникают рецидивы, которые проявляют более высокую устойчивость к терапии, чем исходные опухоли. Проблема рецидивов глиобластом после стандартного лечения остается не решенной. Поэтому необходим поиск новых стратегий лечения этих опухолей. Определение причин повышения резистентности клеток после действия химиопрепаратов и облучения, а также прогностических маркеров глиобластом являются необходимыми для разработки новых способов



лечения этих опухолей. Известно, что в рецидивирующих глиобластомах отмечено изменение экспрессии генов в сторону более агрессивного (мезенхимального) подтипа глиобластом. В прогрессию глиобластом может быть вовлечен эпителиально-мезенхимальный переход. Основными активаторами сигнальных путей, связанных с эпителиально-мезенхимальным переходом, являются такие ростовые факторы как эпидермальный ростовой фактор, трансформирующий ростовой фактор β , фактор роста гепатоцитов. Прогрессии глиобластом способствуют белки внеклеточного матрикса, такие как тенасцин С и тромбоспондин-1, которые обычно продуцируют клетки микроокружения, но в глиобластомах, сами опухолевые клетки могут являться источником белков внеклеточного матрикса. Для решения задач, связанных с исследованием реакции опухолевых клеток на терапевтические воздействия вне влияния сигналов всего организма, используют клеточные линии, при этом наибольший интерес представляют новые клеточные линии, выделенные из опухолевого материала пациентов. Клетки таких линий близки по характеристикам к исходной опухоли, обладают способностью к самовоспроизведению, что позволяет получить достаточное количество материала для исследования.

Таким образом, представленная диссертационная работа, целью которой являлась 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 актуальное исследование.

Научная новизна исследования

В работе получены сведения, не отраженные ранее в литературе, о двух вариантах реакции клеток глиобластом на действие одинаковых генотоксических факторов в зависимости от экспрессии нейрональных маркеров CD56 и CD133/2.

Линии глиобластом A172 и R1, содержавшие популяции CD56 и CD133 позитивных клеток, после действия облучения или фотемустина характеризовались снижением активности генов ряда факторов, связанных с прогрессией опухолей.

В других клеточных линиях (T98G и T2), не экспрессирующих CD56 и CD133, отмечено появление популяции резистентных клеток, представляющих собой одноядерные и многоядерные клетки большого размера. В течение длительного времени после воздействий (срок наблюдения 2 мес) эти клетки не пролиферировали, но сохраняли жизнеспособность. Такие резистентные клетки характеризовались многократным усилением экспрессии ряда генов, связанных с прогрессией опухолей (*HGF*, *EGF*, *TNC*, *FAP* и др.). Подобные клетки представляют большой интерес в связи с их возможной ролью в прогрессии глиобластом.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов основана на использовании комплекса современных методов исследования и статистической обработке результатов экспериментов. Материалы работы были представлены на 10-й конференции по фундаментальной онкологии «Петровские чтения-2014», Санкт-Петербург (Санкт-Петербург, 2015 г.); I Петербургском международном онкологическом форуме «Белые ночи» (Санкт-Петербург, 2015 г., постер); конференции «Молекулярная онкология: итоги и перспективы» (Москва, 2015 г.); II Всероссийской конференции по молекулярной онкологии (Москва, 2016 г.); VI Петербургском международном онкологическом форуме «Белые ночи 2020» (Санкт-Петербург, 2020 г.).

По материалам диссертации опубликовано 9 работ, из которых 4 статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ, и 5 тезисов докладов.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Результаты, полученные в ходе выполнения диссертационной работы, носят фундаментальный характер. Было показано, что действие ионизирующего излучения или фотемустина на линии глиобластом (T98G и T2), не экспрессирующих нейрональные маркеры (CD56 и CD133), может приводить к формированию резистентных клеток, в которых многократно активированы гены ряда ростовых факторов и белков внеклеточного матрикса, влияющих на прогрессию опухолей (HGF, VEGF, TNC и других), а также гены белков, характерных для клеток мезенхимного происхождения. Нейрональные маркеры CD56 и CD133 могут быть рассмотрены как потенциальные маркеры прогноза ответа опухоли на действие облучения или фотемустина. Изучение ответа глиобластом на действие химиопрепаратов и облучения требует дополнительных исследований на большем количестве клеточных линий и образцов первичных культур, полученных из операционного материала.

Практическая значимость исследования заключается в создании автором новых клеточных моделей, включающих две новые клеточные линии глиобластом R1 и T2, выделенные из опухолей пациентов с подтвержденным диагнозом «глиобластома», которые были охарактеризованы и могут быть использованы в дальнейших исследованиях. Кроме того, при проведении диссертационного исследования был разработан и испытан на практике метод облучения клеток на линейном ускорителе Elekta Precise Treatment System™.

Оценка содержания диссертации

Диссертационная работа построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов исследования, их обсуждения, заключения, выводов. Работа включает список сокращений и условных обозначений, список литературы и приложение. Диссертация изложена на 106 страницах машинописного текста и содержит 18 таблиц и 19 рисунков. Библиографический указатель включает 151 публикацию на русском и английском языках.

В обзоре литературы автор дает сведения о современной классификации глиом и гистологическом происхождении этих опухолей, останавливается на гетерогенности глиобластом, фенотипе и характеристиках популяций клеток, подобных стволовым. Автор описывает имеющиеся в литературе сведения о роли некоторых факторов в прогрессии глиобластом и способности клеток глиобластом к эпителиально-мезенхимальному переходу. В завершении обзора автор представляет сведения о клеточных моделях, которые были получены и давно используются для изучения глиобластом.

Методическая часть работы адекватна поставленным задачам и проведена на высоком уровне. Для решения поставленных задач были использованы культуральные, морфологические, иммуноцитохимические методы, проточная цитофлюорометрия, метод полимеразной цепной реакции в режиме реального времени, а также методы статистической обработки. В качестве объектов исследования в представленной работе были использованы четыре клеточных линии глиобластом человека, из которых линии глиобластом R1 и T2, являются новыми и ранее не исследованными, а линии A172 и T98G давно известны как клеточные модели. Для облучения клеточных линий было выбрано фотонное облучение на линейном ускорителе Elekta Precise Treatment System™, которое обычно используется для лечения пациентов с глиобластомой. Выбор химиопрепарата для исследования оправдан, поскольку сведения о влиянии фотемустина на клетки глиобластом очень ограничены в литературных источниках.

В главе «Результаты» автор детально и последовательно описывает полученные результаты экспериментов. В работе было показано, что все клеточные линии различались по пролиферативной активности, характеризовались гетерогенностью, различались по морфологии и фенотипу, содержанию многоядерных клеток, присутствию внутриклеточных маркерных белков, а также по экспрессии в клетках генов ряда факторов, связанных с прогрессией опухолей.

Обнаружено, что в клеточных линиях под воздействием препарата фотемустина или ионизирующего излучения происходило появление популяций клеток с измененной морфологией, которое сопровождалось изменением экспрессии генов *HGF*, *TNC*, *TGFβ1*, *FAP*.

Сравнение исследованных линий показало, что по реакции на действие фотемустина или облучения и свойствам составляющих клеток, линии можно разделить на две пары A172 и R1, T98G и T2, которые различались по реакции на действие одинаковых генотоксических факторов. Основные исходные отличия между этими парами касались в основном фенотипических характеристик - присутствию популяций клеток, экспрессирующих нейрональные маркеры CD56 и CD133.

После действия фотемустина или облучения в клеточных линиях A172 и R1 активность ряда исследованных генов снижалась, а при увеличении дозы воздействия (300 мкг/мл, 50 Гр) все клетки погибали. В культурах другой пары линий T98G и T2 формировались крупные клетки, превышающие размер исходных в несколько раз, которые сохраняли жизнеспособность при высоких дозах воздействия, в таких клетках экспрессия большинства исследованных генов была повышена.

В обсуждении результатов собственных исследований автор анализирует полученные результаты в сопоставлении со сведениями, представленными в современных публикациях других исследователей. В современных литературных источниках представлены сведения, что крупные одноядерные и многоядерные клетки, подобные тем, что были получены в представленной работе, формируются после действия химиопрепаратов и облучения не только в глиобластомах, но и в других опухолях (молочной железы, колоректального рака, простаты, яичников). В представленной работе полученные гигантские клетки не делились, однако сведения, полученные в работах других авторов, свидетельствуют о том, что гигантские многоядерные клетки могут делиться путем ассиметричного деления. Полученные в представленной работе крупные одноядерные и многоядерные клетки

сохраняли жизнеспособность весь срок наблюдения, сохраняли метаболическую активность, в них были активированы гены ряда факторов, связанных с прогрессией опухолей. Такие клетки, вероятнее всего, могут оказывать влияние на окружающие клетки, включая стволовые клетки и клетки микроокружения, и подобным образом способствовать прогрессии заболевания.

Выводы в работе четко сформулированы и соответствуют поставленной цели и задачам.

Принципиальных замечаний по существу и оформлению диссертационной работы нет.

Рекомендации о практическом применении результатов диссертационного исследования

Полученные результаты диссертационного исследования могут быть использованы в создании панели прогностических маркеров глиобластом, которая должна будет включать нейрональные маркеры CD56 и CD133.

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 по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология, выполненная под руководством доктора биологических наук Самойлович Марины Платоновны, является завершенной научно-квалификационной работой.

По своей актуальности, научной новизне, объему выполненных исследований и практической значимости результатов диссертация полностью соответствует требованиям п.9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от

