

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора медицинских наук, доцента Кручининой Маргариты Витальевны на диссертационную работу Коловской Ольги Сергеевны «Адресная коррекция опухолевых процессов многофункциональными молекулярными конструкциями с распознающими элементами – ДНК-аптамерами», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.4 – биохимия в диссертационный совет 24.1.242.02 на базе ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины»

Актуальность темы диссертации

Несмотря на разнообразие существующих методов диагностики онкологических заболеваний, основная масса больных выявляется на поздней стадии, когда исход лечения уже неблагоприятен. Именно поэтому актуальность разработки новых методов диагностики и противоопухолевой терапии остается крайне актуальной. В диссертационной работе Коловская О.С. предлагает нестандартные подходы к разработке диагностических и терапевтических препаратов на основе нового класса распознающих молекулярных элементов – ДНК-аптамеров, которые получают с использованием технологии SELEX, позволяющей осуществлять направленный отбор олигонуклеотидов, обладающих высоким средством к заданным биологическим мишениям.

Возможность использования аптамеров, однонитевых ДНК- и РНК-олигонуклеотидов, для диагностики и терапии онкологических заболеваний стала изучаться сравнительно недавно. Многочисленные исследования, проведенные в этой области, уже показали широкие перспективы их применения для идентификации различного рода мишней при выявлении онкологических заболеваний в модельных экспериментах.

Целью диссертационного исследования стала разработка подходов к эффективной и малоинвазивной диагностике и терапии онкологических

заболеваний, основанных на многофункциональных молекулярных конструкциях с адресными распознающими элементами – ДНК-аптамерами. Цель достигалась путем решения задач, включающих в себя получение и исследование чувствительности и специфичности ДНК-аптамеров к клеткам АКЭ *in vitro* и *in vivo*, разработку на основе аптамеров наноконструкций для адресной деструкции опухолей, оценку их противоопухолевого эффекта и исследование токсичности и биосовместимости наноконструкций на основе аптамеров.

Обоснованность и целостность излагаемой научной концепции

Проведенные автором исследования позволили вынести на защиту пять положений, представляющих собой целостную концепцию по разработке технологии адресной диагностики и терапии онкологических заболеваний, обоснованность которых не вызывает сомнений.

В первом положении, выносимом на защиту, доказывается высокая степень аффинности и специфичности полученных автором с помощью технологии cell-SELEX ДНК-аптамеров к клеткам АКЭ. Во втором положении с помощью стандартных клинических методов (ПЭТ/КТ и МРТ) подтверждается, что ДНК-аптамеры к клеткам АКЭ связываются со своими мишениями *in vivo*. В третьем положении, выносимом на защиту, приводятся экспериментальные подтверждения деструкции солидных опухолей с помощью функционализированных аптамерами золотых наночастиц методом плазмонной фототермической терапии. В четвертом положении доказывается, что в переменном магнитном поле с помощью дистанционного управления магнитными наночастицами, функционализированными ДНК-аптамерами, *in vivo* достигается противоопухолевый эффект. В пятом положении доказывается высокая противоопухолевая эффективность адресной доставки ДНК-аптамерами препаратов химиотерапии при минимальном уровне токсичности.

Все выводы, сформулированные в диссертации, полностью обоснованы и соответствуют положениям, которые были вынесены на защиту.

Научная новизна

Представленные в диссертационной работе результаты были получены с помощью нестандартных подходов и отличаются новизной. С помощью технологии SELEX были впервые разработаны молекулярные распознавающие элементы на основе ДНК-аптамеров к клеткам АКЭ, которые как *in vitro*, так и *in vivo* оказались высокоспецифичными и высокоаффинными к асцитным клеткам, что было доказано, в том числе стандартными клиническими методами – ПЭТ/КТ и МРТ. Впервые были получены наноконструкции на основе ДНК-аптамеров к клеткам АКЭ, которые после их связывания с опухолями *in vivo* позволяли дистанционно управлять деструкцией опухолевых клеток. Впервые на основе ДНК-аптамеров к асцитным клеткам были синтезированы наноконструкции, которые были использованы для адресной доставки к опухолям *in vivo* стандартных препаратов химиотерапии – циклофосфамида и цисплатина.

Достоверность полученных результатов

Достоверность полученных результатов не вызывает сомнений, поскольку они были получены на современном оборудовании с использованием стандартизованных методик и программ. Селекция аптамеров проведена с использованием термоциклира SensoQuest (Германия), Eppendorf (США). Контроль селекции аптамеров осуществляли с использованием гель-документирующей системы GBOX/EF2-E. Секвенирование последовательностей аптамеров было проведено «Génome Québec Innovation Centre» (Канада). Последовательности аптамеров были синтезированы «Integrated DNA Technologies» (США). Результаты экспериментов были проанализированы с помощью программного обеспечения: Kaluza 1.1, MaxQuant 1.3, SIMCA, FlowJo, FlowingSoftware 2.5.1, Microsoft Excel 2007, Origin 6.0, базе данных UniProtKB/Swiss-Prot. Результаты работы неоднократно проходили апробацию на российских и международных конференциях и публиковались в рецензируемых журналах.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость работы заключается в оптимизации и модификации метода селекции ДНК-аптамеров к клеткам злокачественных опухолей и создании на их основе наноконструкций для диагностики и терапии онкологических заболеваний. Разработанные технологии получения наноконструкций для адресной доставки средств терапии создают теоретическую основу для создания противоопухолевых препаратов. Полученные аптамеры и технологии их получения используются в научно-исследовательской работе в Лаборатории биомолекулярных и медицинских технологий на базе КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России и Лаборатории цифровых управляемых лекарств и терапии ФИЦ КНЦ СО РАН для создания средств терапии рака легкого и глиобластомы.

Общая характеристика работы. Оценка содержания работы, ее завершенности и оформления.

Диссертация написана по традиционной схеме и состоит из введения, обзора литературных источников, описания объектов и методов исследования, результатов исследования и их обсуждения, заключения и выводов. Работа изложена на 287 страницах, иллюстрирована 89 рисунками и 6 таблицами. Список литературы включает 352 источника, из них 4 отечественных и 348 зарубежных.

Во «Введении» излагается важность проблемы, обосновывается ее актуальность, цель и задачи исследования, формулируются выносимые на защиту положения, описывается научная новизна, научно-практическая значимость и собственный вклад в работу, приводятся данные об апробации выполненной работы.

В «Обзоре литературы» излагаются современные представления о ДНК-аптамерах, магнитных и золотых наночастицах и наноконструкциях на их основе. Описывается распределение и биосовместимость магнитных наночастиц. По результатам анализа литературных источников автор

формулирует проблему, обосновывает цель и задачи диссертационной работы.

В главе «Материалы и методы исследования» детально описывается технология селекции ДНК-аптамеров, методы определения аффинности полученных пулов аптамеров, бактериальное клонирование лучшего пула аптамеров и выбор лучших последовательностей. Достаточно подробно описываются методы изучения аптамеров и определения их молекулярных мишени. Обстоятельно представлен метод синтеза противоопухолевых наноконструкций и основные методические подходы к исследованию их противоопухолевых эффектов. Адекватность использованных в исследовании методических приемов не вызывает сомнений.

В главе «Результаты и их обсуждение» проанализированы свойства и конформации ДНК-аптамеров, полученных с помощью технологии cell-SELEX к клеткам АКЭ. Описаны потенциальные молекулярные мишени ДНК-аптамеров. Кроме того, проведен анализ свойств противоопухолевых и диагностических наноконструкций на основе аптамеров. Достаточно подробно описаны все биологические эффекты полученных наноконструкций на основе ДНК-аптамеров. Отдельно проведена оценка биосовместимости и токсичности диагностических и противоопухолевых наноконструкций на основе ДНК-аптамеров.

В главе «Заключение» проанализированы результаты и подведены итоги выполненных исследований. Сделанные выводы подтверждены результатами исследований и полностью соответствуют положениям, вынесенным на защиту.

В целом, следует отметить, что диссертационное исследование хорошо структурировано и логично построено; работа содержит новые научные результаты, что свидетельствуют о значительном вкладе Коловской О.С. в науку. Диссертация написана хорошим научным языком, экспериментальный материал хорошо иллюстрирован.

Апробация результатов исследования и их публикация

Результаты исследования неоднократно представлялись на российских и международных конференциях в виде устных и постерных докладов в России, Тайване, Франции, Италии, Великобритании и Нидерландах. Материалы диссертации опубликованы в 19 научных работах, в том числе 11 – в зарубежных журналах; 1 – в зарубежной монографии; 7 – в российских журналах, рекомендованных ВАК; и одном патенте. Автореферат и опубликованные работы в полной мере отражают основные положения диссертации.

Замечаний по форме, способу изложения и содержанию диссертации нет.

Вопросы и замечания:

1. В работе недостаточно подробно описаны силы, обеспечивающие аффинность и специфичность аптомеров. Каковы силы связывания, опосредующие взаимодействие аптомер-мишень?
2. Почему аптомеры, несмотря на такой мощный диагностический и терапевтический потенциал, до настоящего времени не приобрели большую популярность в медицине, в том числе при лечении злокачественных новообразований?
3. Какова судьба магнитных нанодисков при использовании их в процессе микрохирургии опухолей? Каково их распределение в организме? Где происходит их накопление и как они выводятся из организма?

Следует отметить, что заданные вопросы ни в коей мере не снижают общего положительного впечатления о работе.

Заключение

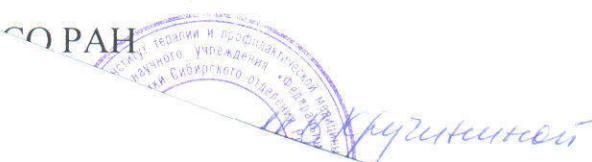
Диссертация Ольги Сергеевны Коловской на тему «Адресная коррекция опухолевых процессов многофункциональными молекулярными конструкциями с распознающими элементами – ДНК-аптамерами» является законченной научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором экспериментальных исследований решена актуальная

научная проблема адресной коррекции опухолевых процессов с помощью ДНК-аптамеров. Разработанные автором теоретические и практические положения, представленные в диссертации, позволяют квалифицировать работу как большое научное достижение, предлагающее инновационный подход к созданию новых технологий таргетной терапии онкологических заболеваний. Методология разработки противоопухолевых наноконструкций на основе ДНК-аптамеров имеет неоспоримо важное значение для развития нового направления в биохимии. По актуальности решаемой в диссертационной работе проблемы, использованному комплексу методов, новизне и достоверности результатов, научной и практической значимости и объему материала диссертационная работа Коловской Ольги Сергеевны «Адресная коррекция опухолевых процессов многофункциональными молекулярными конструкциями с распознавающими элементами – ДНК-аптамерами» полностью соответствует требованиям п.9 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24.09.2013г., предъявляемым к докторским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.4 – биохимия.

Официальный оппонент:

доктор медицинских наук, доцент,
ведущий научный сотрудник лаборатории
гастроэнтерологии НИИТПМ – филиала ИЦиГ СО РАН

Кручинина Маргарита Витальевна *M.Kr.*
15.05.2023 г.



Контактные данные:

Тел.: +7 913 000 98 19; e-mail: kruchmargo@yandex.ru

Специальности, по которым официальным оппонентом защищена диссертация: 14.00.05 – внутренние болезни, 14.00.16 – патологическая физиология

Адрес места работы: 630089, г. Новосибирск, ул. Бориса Богаткова 175/1
НИИТПМ – филиал ИЦиГ СО РАН

Тел.: +7 (383) 373-09-81; e-mail: niitpm.office@gmail.com