

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора медицинских наук, профессора

Агеевой Татьяны Августовны

на диссертационную работу Есимбековой Александра Рашидовны «Влияние дакарбазина на внутриклеточную сигнализацию в культуре клеток меланомы кожи SK-MEL-2 в G₀ фазе», представленную на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.22. Клеточная биология

Актуальность темы

Меланома кожи характеризуется высокой агрессивностью, ранним метастазированием и значительной устойчивостью не только к цитостатической и лучевой терапии, но и к таргетным препаратам, что делает ее релевантной моделью для исследования механизмов канцерогенеза. Несмотря на включение достижений в области молекулярной таргетной терапии и иммунотерапии в схемы лечения меланомы, уровень выживаемости пациентов с метастатической меланомой все еще остается низким, и более половины из них сталкиваются с рецидивами заболевания в течение нескольких месяцев после лечения.

Диссертационная работа Есимбековой А.Р. акцентирует внимание на клеточном покое опухолевых клеток и его роли в канцерогенезе, что является важным аспектом в процессе опухолевой резистентности, поскольку именно эта популяция опухолевых клеток наименее чувствительна к действию противоопухолевых препаратов. Это особенно важно для меланомы, поскольку она характеризуется высокой гетерогенностью клеточного состава, что обуславливает ее высокую пластичность и высокий риск возникновения отсроченных «спящих» метастазов даже при небольших размерах первичной опухоли и распространенного метастазирования вообще.

Исследование механизмов, связанных с переходом клеток в G₀ фазу клеточного цикла, может открыть новые горизонты для разработки более эффективных методов лечения, направленных на специфические клеточные популяции, включая покоящиеся клетки.

Вышесказанное обуславливает высокую актуальность диссертационного исследования, посвященного влиянию дакарбазина на внутриклеточную

сигнализацию в культуре клеток меланомы кожи SK-MEL-2. Также важно подчеркнуть обоснованный выбор цитостатического препарата дакарбазин - алкилирующего агента, который используется более четырех десятилетий и остается до сих пор препаратом выбора для лечения диссеминированных форм меланомы. Таким образом, актуальность диссертационной работы Есимбековой А.Р. заключается в углублении понимания молекулярных механизмов, лежащих в основе устойчивости меланомы к противоопухолевой терапии, а также в поиске новых стратегий, которые могут улучшить результаты лечения и повысить выживаемость пациентов не только с меланомой, но и с другими опухолями.

Оценка новизны и достоверности

В исследовании Есимбекова А.Р. в культуре клеток разработала метод повышения доли G₀-положительных клеток с использованием дакарбазина и впервые продемонстрировано, что дакарбазин, традиционно используемый в терапии меланомы, вызывает значительное увеличение доли не только обратимо спящих клеток в G₀ фазе клеточного цикла, но и стареющих, что подчеркивает важность понимания механизмов действия цитостатических препаратов на различные субклоны опухолевых клеток, особенно на покоящиеся клетки, которые часто устойчивы к лечению. Кроме того, впервые показано изменение экспрессии участников сигнального пути p53 в клетках SK-MEL-2 при увеличении доли G₀-положительных клеток под действием дакарбазина, что согласуется с данными о роли этого пути в формировании G₀-положительных клеток.

Впервые с использованием культуры клеток меланомы кожи SK-MEL-2 было исследовано влияние дакарбазина на активность фосфорилирования компонентов сигнального каскада MAPK. Впервые показано усиление адгезивных свойств дормантных клеток меланомы кожи линии SK-MEL-2 за счет связывания с такими компонентами внеклеточного матрикса, как коллаген IV типа, фибронектин и ламинин, что может отражать их роль в формировании преметастатических ниш.

В исследовании автор акцентирует внимание на гетерогенности опухолевых клеточных популяций в меланоме: продемонстрирована разнородная реакция клеток меланомы на цитостатический препарат, что может объяснять рецидивирующий характер заболевания и является важным аспектом для разработки более эффективных терапевтических стратегий. Результаты

исследования показывают, что оценка доли G_0 -положительных клеток в меланоме важна для разработки эффективной стратегии ее терапии, направленной на специфические клоны клеток, реализуя индивидуализированный подход к лечению опухоли.

Диссертация Есимбековой Александры Рашидовны представляет собой значимый вклад в изучение влияния дакарбазина на внутриклеточную сигнализацию в культуре клеток меланомы кожи SK-MEL-2. Автор тщательно проанализировала существующую литературу, что позволило ей выделить ключевые аспекты и сделать акцент на роли покоящихся клеток в канцерогенезе и их устойчивости к химиотерапии. Методология исследования, включая использование проточной цитометрии и иммуноцитохимического анализа, позволила получить надежные данные о влиянии дакарбазина на клеточный цикл и экспрессию генов.

Полученные данные обосновывают возможность использования дакарбазина для моделирования G_0 -позитивных опухолевых клеток в дальнейших исследованиях.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций

Научная гипотеза диссертации основана на тщательном анализе современной литературы, научные положения, представленные в диссертации, сформулированы на основании собственных экспериментальных данных с учетом имеющихся сведений других исследователей по этому вопросу. Диссертационное исследование основано на культуральных технологиях, грамотно спланировано, выполнено с использованием молекулярных высокоинформативных методов: проточная цитометрия, иммуноцитохимия, ПЦР в реальном времени и микрочипирование, что позволило достоверно оценить влияние дакарбазина на клеточный цикл и выявить изменения в экспрессии генов, связанных с регуляцией клеточного цикла. Выводы о роли G_0 -положительных клеток в канцерогенезе и их связи с устойчивостью к лечению подкреплены статистическим анализом, что подтверждает их научную обоснованность.

Для получения результатов освоена современная приборная база, использованы реактивы ведущих фирм-производителей, что подробно описано в разделе «Материалы и методы». Полученные результаты валидны. В оценке

клеточного цикла для подтверждения индуцированного дакарбазином повышения доли G₀-положительных клеток использовали несколько независимых методов, это проточная цитометрия и иммуноцитохимическое исследование, которые показали однонаправленную тенденцию к увеличению доли клеток в фазе G₀ после использования цитостатика. Результаты транскриптома сопоставимы с результатами ПЦР в режиме реального времени. Такой подход к исследованию не оставляет сомнений в достоверности полученных А.Р. Есимбековой результатов. Все используемые методы современны, адекватны, соответствуют решению поставленных задач. Корректный статистический анализ позволяет не сомневаться в достоверности полученных фактов, что существенно повышает значимость выводов и положений диссертации. Информативность и чёткость изложения свидетельствует о высокой квалификации А.Р. Есимбековой как экспериментатора.

Результаты проведенного исследования документированы в 7 таблицах и хорошо иллюстрированы в 17 рисунках, представленных в работе.

Представленные в работе положения описаны развернуто и обосновано. Выводы, сделанные в результате исследования, корректны и аргументированы. Полученные новые научные данные прошли широкую апробацию в рамках научных конференций всероссийского и международного уровней.

В целом, работа демонстрирует высокий уровень научной подготовки автора и значимость полученных результатов для клинической практики. Рекомендуется продолжить исследования в данном направлении, чтобы более глубоко понять механизмы действия дакарбазина и его влияние на различные клеточные популяции в опухолях. Таким образом, работа имеет весомое значение для клинической практики и научных исследований, направленных на улучшение исходов терапии пациентов с меланомой.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы по теме исследования, материалов и методов, использованных в работе, описания полученных результатов, их обсуждения, выводов, практических рекомендаций, списка использованных сокращений и списка литературы. Полный объем составляет 140 страниц. В текст работы включено 17 рисунков и 7 таблиц. Список литературы содержит 284 источника.

В главе «Введение» Есимбекова А.Р. обосновывает актуальность исследований, приводит степень разработанности темы, указывает цель и поставленные задачи, формулирует положения, выносимые на защиту, новые научные результаты, представляет практическую значимость и апробацию результатов.

В главе «Обзор литературы» автор дает краткую характеристику этиологических факторов возникновения меланомы, эпидемиологических показателей и современные подходы к терапии. Далее концентрируется на описании dormantного поведения клеток, их роли в процессе канцерогенеза, существующим методам анализа клеточного цикла и старения клеток, а также известных механизмах сигнализации в dormantных клетках. Работа демонстрирует глубокое понимание механизмов канцерогенеза, проблем онкологии, особенно в контексте меланомы, которая остается одной из самых сложных для лечения.

В главе «Материалы и методы» описывается используемая клеточная линия, метод определения концентраций дакарбазина. Автор приводит полное и подробное описание выбранных методик. В работе с культурой клеток меланомы кожи SK-MEL-2 использованы методы классической иммуноцитохимии и проточной цитометрии, микрочипирования и ПЦР в реальном времени, а также современные способы визуализации с помощью флуоресцентной микроскопии и системы гель-документирования хемилюминесценции, дополняющие и уточняющие классические техники. Приведено описание методов статистической обработки полученных результатов. Выбранные методы в полной мере позволяют решить поставленные задачи и достигнуть поставленной цели. Результаты получены на достаточном количестве экспериментального материала.

В главе «Результаты собственных исследований» автор описывает изменение процентного соотношения клеток меланомы в различных фазах клеточного цикла после действия на них цитостатиком и детально описывает сопровождающиеся при этом изменения экспрессии различных сигнальных молекул. Особое внимание уделяется функциональным категориям «Сигнальный путь p53» и «Клеточный цикл». Дана краткая характеристика функции дифференциально экспрессируемых генов. Необходимо отметить, что схема исследования построена логично и каждый последующий этап вытекает из результатов предыдущего. Так, на основании

результатов микрочипирования и биоинформатического анализа данных дальнейшее направление исследования было сосредоточено на функциональных категориях с наибольшим количеством дифференциально экспрессируемых генов. Приведены результаты анализа активности фосфорилирования компонентов сигнального каскада MAPK и экспериментов, основанных на оценке адгезивной способности клеток после повышения в них доли G₀-положительной популяции.

Достоинством работы является хорошо продуманное обсуждение, где диссертант продемонстрировал не только свою эрудицию, но и способность сопоставлять, анализировать, размышлять и выдвигать вполне обоснованные доводы для объяснения полученных фактов. Обсуждение отличается логичностью, последовательностью и всесторонностью доказательств основных результатов. В обсуждении и выводах диссертации четко определена значимость полученных новых данных о повышении под действием цитостатического препарата доли спящих опухолевых клеток, а также описаны возможные подходы и схемы терапии для эрадикации данной популяции опухолевых клеток.

Полученные результаты Есимбекова А.Р. сопоставляет с результатами других исследовательских групп по данным литературных источников. Описывается возможное обоснование усиления фосфорилирования компонентов MAPK каскада. Автор приводит детальную характеристику дифференциально экспрессируемых генов и находит взаимосвязь изменения их экспрессии и формирования состояния дормантности, сопровождаемого усилением адгезивных свойств клеток. В завершающей части обсуждения автор сосредотачивается на возможных подходах эрадикации дормантного пула опухолевых клеток, в том числе с воздействием на повышенную адгезивную способность клеток.

В заключении работы сформулированы основные выводы и результаты работы, показано достижение цели работы путем решения поставленных задач.

Результаты исследования могут способствовать разработке персонализированных подходов к терапии меланомы, учитывающих пропорцию G₀-положительных клеток в опухолях, что является важным шагом к более эффективному лечению данного заболевания.

Соответствие содержания автореферата основным положениям и выводам диссертации

Автореферат полностью отражает основное содержание диссертации, сохраняет ее структуру и последовательность изложения материалов, оформлен в соответствии с требованиями п. 25 Положения о присуждении ученых степеней.

Замечания по диссертации

Принципиальных замечаний по представленной диссертационной работе нет. Тем не менее, в работе можно выделить несколько аспектов, требующих дополнительного внимания. Во-первых, было бы полезно более подробно рассмотреть/указать возможные механизмы, способствующие развитию лекарственной устойчивости у клеток меланомы. В разделе материалов не хватает некоторой важной информации. Например, в какой концентрации добавляли диметилсульфоксид, который вы использовали в группе контроля? В таких методах как проточная цитометрия и иммуноцитохимическое исследование не указано время инкубации клеток с фиксаторами (этанол/формалин), РНКазой и пропидия йодидом.

В разделе «Результаты» подробно описаны и затем в главе «Обсуждения» проанализированы результаты по функциональным категориям «Сигнальный путь p53», «Клеточный цикл», «Сигнальный путь MAPK» и «Фокальная адгезия-PI3K-Akt-mTOR-сигнальный путь», однако не приводится подробной характеристики других функциональных категорий, приведенных в Таблице 3. Чем обусловлен такой выбор групп дифференциально экспрессирующихся генов для более подробного анализа?

Помимо вышеперечисленных замечаний есть вопросы для обсуждения:

Почему в качестве объекта исследования была выбрана клеточная линия? Почему не использовали первичные клеточные культуры?

Какое значение может иметь увеличение доли стареющих опухолевых клеток для прогрессии новообразования?

По данным литературы какие еще существуют способы активации «спящих» субпопуляций опухолевых клеток? Реализован ли такой подход для каких-либо иных опухолей?

Отмеченные недостатки не влияют на главные теоретические и практические результаты диссертации.

Заключение

Диссертация Есимбековой Александры Рашидовны «Влияние дакарбазина на внутриклеточную сигнализацию в культуре клеток меланомы кожи SK-MEL-2 в G₀ фазе» является самостоятельной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной задачи – выявление сигнальных молекул с измененной экспрессией в клетках меланомы в G₀ фазе клеточного цикла, подвергшихся действию цитостатического препарата дакарбазина, имеющей важное значение для клеточной биологии, онкоморфологии и онкологии. Диссертационное исследование по актуальности проблемы, высокому научно-методическому уровню, новизне и значимости результатов, полноте их опубликования отвечает критериям «Положения о порядке присуждения ученых степеней», предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор Есимбекова Александра Рашидовна заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.22 Клеточная биология.

Официальный оппонент:

доктор медицинских наук, профессор кафедры патологической анатомии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, профессор

Агеева Татьяна Августовна _____

«22» ноября 2024 г.

Подпись Агеевой Т.А. заверяю:

Ученый секретарь Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, д.м.н., профессор

Осипенко Марина Федоровна _____