

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора медицинских наук профессора Макаровой Ольги Васильевны на диссертацию Науменко Виктора Алексеевича «Механизмы трансэндотелиального переноса частиц наноразмерного диапазона в микроциркуляторном русле опухолей», представленной на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальностям 1.5.4. Биохимия, 1.5.22. Клеточная биология

Актуальность темы выполненной работы

Диссертационное исследование Виктора Алексеевича Науменко чрезвычайно актуально, так как оно посвящено изучению механизмов доставки противоопухолевых лекарственных средств в составе наночастиц, а также онколитических вирусов. По данным Всемирной организации здравоохранения злокачественные опухоли является одной из главных причин смертности, во всем мире, в 2020 году от онкологических заболеваний умерли 10 миллионов человек. В России в 2021 году было 3,7 миллиона больных, страдающих опухолевыми заболеваниями. Онкологические заболевания являются одной из основных причин смертности, потери трудоспособности, снижения качества жизни и экономических потерь. Относительно низкая эффективность традиционных методов лечения злокачественных новообразований, таких как радикальная операция, химио- и лучевая терапия, диктует необходимость поисков новых подходов к решению проблем терапии этих заболеваний. В этом плане наномедицина и бурно развивающиеся нанотехнологии являются весьма перспективными для повышения эффективности химиотерапии злокачественных опухолей. Нанотехнологии позволяют создавать способы увеличения концентрации лекарственных веществ в опухолевых тканях и снижать их токсические эффекты. Кроме того в сочетании с

методом магнитно-резонансной томографии ряд типов наночастиц, например магнитных, могут использоваться для диагностики опухолевых заболеваний. Диагностические и терапевтические возможности применения наночастиц позволяют осуществлять персонализированный подход к лечению и прогнозированию течения опухолевых заболеваний.

Новым направлением лечения онкологических заболеваний является онколитическая вирусная терапия. В ее основе лежит использование вирусов, которые способны находить, инфицировать и разрушать опухолевые клетки, не оказывая существенного влияния на нормальные ткани. Наночастицы и онколитические вирусы находятся в одинаковом диапазоне размеров - десятки-сотни нанометров и, как следствие, для них характерны сходные механизмы проникновения в опухоль. Несмотря на оптимистические прогнозы, связанные с использованием для терапии злокачественных опухолей наночастиц и онколитических вирусов, оказалось, что только 0,7% от вводимой дозы частиц оказывается в опухоли и значительно улучшить этот показатель до сих пор не удалось. Для повышения эффективности существующих и разработки новых стратегий лечения онкологических заболеваний с помощью нанолекарств необходимо дальнейшее детальное исследование механизмов доставки наночастиц и онколитических вирусов в опухоль.

Таким образом, цель диссертационного исследования В.А. Науменко – изучение механизмов доставки и противоопухолевой активности наночастиц и онколитических вирусов с использованием метода интравитальной микроскопии является актуальной.

Новизна исследования и полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

В диссертационной работе В.А. Науменко в системе *in vivo* с помощью прижизненного биомикроскопического исследования установлены неклочеч-

ные и клеточные механизмы транспорта наночастиц и онколитических вирусов из кровеносных сосудов в опухолевые и неизменные ткани. Работа является уникальной по постановке цели, задач, применению большого количества самых современных высокотехнологичных методов исследования, объему экспериментального материала и востребованности результатов в области клеточной биологии и онкологии. По существу в области клеточной биологии эта работа является образцом научных исследований будущего.

Автором впервые установлен новый механизм выведения наночастиц с порогом выше размеров пор почечного фильтра. Показано, что наночастицы путем транцитоза через эндотелий капилляров соединительной ткани, окружающей канальцы почки, мигрируют в эпителий почечных канальцев, откуда попадают в их просвет.

Определены механизмы клеточного транспорта наночастиц магнетита, липосом и онколитических вирусов. Наночастицы магнетита и онколитические вирусы выявляются в нейтрофилах, а липосомы в макрофагах.

Показано, что доставка липосом в опухоль происходит, в основном, путем спонтанных микро- и макроутечек. Нейтрофилы, мигрирующие через стенку гемокапилляров, могут вызывать утечки липосом в окружающие ткани. Соотношение пассивного и клеточного транспорта связано со временем циркуляции наночастиц.

Определены особенности накопления наночастиц в микроокружении опухолевых клеток. Наночастицы магнетита накапливаются в макрофагах, а липосомы в перицитах и макрофагах.

Выявлены не описанные ранее неопухолевые клетки-мишени для онколитических вирусов - В-лимфоциты и перициты.

Впервые показано, что противоопухолевая активность первой и повторной дозы онколитических вирусов опосредованы принципиально разными механизмами, в то время как микрораспределение первой дозы липосом в опухоли полностью соответствует таковому при их повторном введении.

Автором разработан и валидирован метод интравитальной микроскопии для визуализации нанообъектов в опухолевых и неизмененных тканях висцеральных органов, который позволяет изучать прижизненное взаимодействие наночастиц и онколитических вирусов с клетками организма в их естественной среде. Описанный В.А. Науменко способ хирургической подготовки препарата опухоли для интравитального исследования позволяет добиться высокой стабильности зоны визуализации, а подобранная панель флуоресцентных красителей обеспечивает одновременную детекцию до 8 маркеров при использовании однофотонной конфокальной микроскопии и до 5 маркеров при применении мультифотонного лазера.

Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Материал и методы диссертационной работы адекватны цели и задачам исследования, изложены полно и детально. В.А. Науменко продемонстрировал владение широким спектром классических и современных, в том числе эксклюзивных, высокотехнологичных методов исследования в области клеточной биологии - интравитальной микроскопии с использованием однофотонной и конфокальной микроскопии и мультифотонного лазера, электронной микроскопии, иммуногистохимии, иммуноферментного анализа, полимеразной цепной реакции, иммуноблотинга и ряда других, а также статистические методы. Особенно хочется отметить огромный труд автора, вложенный в реализацию цели и решение задач исследования.

Работа иллюстрирована схемами, микрофотографиями высокого качества, информативными таблицами и графиками, количественные данные подвергнуты корректной статистической обработке.

Благодаря перечисленному выше, полученные автором результаты, основанные на огромной базе данных, современном методическом уровне и ко-

личественном анализе, определили обоснованность и достоверность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.

Сформулированные автором выводы достоверны и не противоречат полученным результатам.

Значимость для науки и практики полученных автором результатов

Теоретическая и практическая значимость исследования заключается в том, что установлены ряд новых механизмов попадания в ткани, включая опухолевые, наночастиц и онколитических вирусов. Расшифрован механизм парадоксальной почечной фильтрации крупных наночастиц. Показано, что доставка наночастиц в опухоль осуществляются путем механизмов экстравазации в зависимости от степени и выраженности представленной микро- и макроутечками, а также клеточными механизмами с участием нейтрофилов, макрофагов, перицитов и В лимфоцитов.

Специфическое инфицирование перицитов опухоли при системном введении онколитических вирусов, показанное в данной работе, является существенным дополнением к принятой на данный момент парадигме противоопухолевой активности онколитической вирусной терапии.

Практическая значимость исследования заключается в обосновании схем противоопухолевой терапии, исходя из особенностей распределения и путей поступления наночастиц и онколитических вирусов при их повторном введении.

По сравнению с однократным повторное введение вируса позволяет достичь более выраженного терапевтического эффекта. Напротив, первая и вторая дозы липосом демонстрируют идентичное поведение *in vivo*, что позволяет использовать диагностическую дозу магнитно-контрастных липосом для индивидуального прогнозирования эффективности лечения липосомальными препаратами. Кроме того, обнаружение нового механизма выведения круп-

ных наночастиц в почках открывает возможность использования нанопрепаратов для диагностики и лечения нефрологических заболеваний.

Выявление нейтрофил-ассоциированного транспорта наночастиц в опухоль дает обоснование для использования этих клеток в качестве векторов доставки препаратов. Идентификация перицита как новой клетки-мишени в опухолевом микроокружении, общей для липосом и онколитических вирусов открывает перспективу разработки принципиально новых схем противоопухолевой терапии. Так, увеличение чувствительности перицитов к вирусной инфекции может быть достигнуто за счет неоадьювантной терапии липосомальными препаратами, несущими цитокины.

Полученные в работе теоретические данные могут быть использованы для разработки новых подходов для доставки с помощью наночастиц и онколитических вирусов к перицитам молекул, обладающих антиангиогенными свойствами.

Структура диссертации и автореферата

Диссертационная работа изложена на 394 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, раздела «Материалы и методы исследования», 8 глав результатов собственных исследований, обсуждения, заключения и выводов. Список цитируемых в диссертации литературных источников представлен 582 статьями отечественных и зарубежных авторов. Иллюстративный материал высокого качества, включает 191 рисунок и 3 таблицы. В автореферате в полном объеме отражены основные результаты исследования. Диссертация и автореферат написаны грамотным русским языком.

Во введении кратко, но достаточно полно, обоснована актуальность исследования, цель и задачи работы, новизна, положения, выносимые на защиту, четко сформулированы.

При выполнении работы автором проведен глубокий и всесторонний анализ литературы по исследуемой проблеме. В обзоре литературы проанализированы публикации по биораспределению и механизмам экстравазации частиц наноразмерного диапазона и онколитических вирусов в различных органах и тканях, включая опухолевые, в зависимости от размеров и физико-химических свойств наночастиц. Охарактеризована роль клеток - нейтрофилов, макрофагов и их M1 и M2 фенотипов, перицитов в транспорте наночастиц. Следует отметить, что обзор иллюстрирован информативными схемами, четко структурирован, и каждый из его разделов заканчивается выводами с акцентом на нерешенные проблемы транспорта наночастиц.

В главе материалы и методы исследования тщательно и детально охарактеризованы объекты исследования – липосомы, наночастицы магнетита и онколитические вирусы. Два типа наночастиц магнетита, липосомы и онколитические вирусы исследованы по общей схеме: валидация биологических свойств флуоресцентно-меченных объектов, исследование биораспределения наночастиц и онколитических вирусов, оценка путей доставки наночастиц и онколитических вирусов в опухоль, описание клеток-мишеней в опухолевом микроокружении, исследование особенностей распределения и транспорта наночастиц и онколитических вирусов при их первом и повторном введении.

Работа характеризуется применением современных эксклюзивных высокотехнологичных методов. Они тщательно описаны, поэтому могут быть легко воспроизведены другими авторами. Дана физико-химическая характеристика флуоресцентно-меченных наночастиц магнетита – кубов и кластеров, липосом и др. наночастиц. В работе в качестве объектов исследования использованы 8 линий мышей, включая нокаутных, около 20 видов культур клеток, включая стабильно экспрессирующие флуоресцентные белки, биологические свойства которых полно охарактеризованы. С целью исследования транспорта онколитических вирусов автор использовал меченные

флюороресцентными белками вирус везикулярного стоматита, реовирус и вирус осповакцины. Оценка свойств наночастиц проведена с помощью методов трансмиссионной микроскопии, динамического светорассеивания, рентгеновской дифракционной спектроскопии и спектрофотометрии. Стабильность комплекса наночастицы-краситель оценивалась путем инкубации наночастиц с последующей оценкой фильтрата с помощью спектроскопии. Цитотоксичность наночастиц определяли с помощью MTS теста и в тесте Аламар - синего. Для исследования взаимодействия наночастиц с клетками применяли метод резонансной сканирующей конфокальной микроскопии и мультифотонной микроскопии в системе *in vivo* на моделях опухолей у животных

Использованные методы адекватны поставленным экспериментальным задачам. Статистическая обработка результатов убеждает в их достоверности и высоком научно-методическом уровне диссертационного исследования.

В 8-и главах диссертации последовательно и логично изложены результаты собственных исследований, которые иллюстрированы информативными рисунками высокого качества. В обсуждении автор обсуждает полученные данные, используя сведения из многочисленных литературных источников.

Благодаря вышеперечисленному, полученные автором результаты, основанные на большой базе данных и количественном анализе, определили обоснованность и достоверность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.

Освещение диссертации в научной печати

Результаты диссертационного исследования В.А. Науменко многократно доложены на конференциях разного уровня, а также им опубликованы 15 статей в зарубежных и отечественных журналах, входящих в Перечень РФ рецензируемых научных журналов, 9 из них - в изданиях, входящих по импакт-

фактору в первый квартиль (Q1).

Замечаний к рецензируемой работе нет, но есть вопросы

1. В формировании микро- и макроутечек наночастиц из сосудистого русла может играть роль гипоксия, поэтому этот вид транспорта наночастиц в опухоли с низким с парциальным давлением кислорода вполне закономерен. Были ли различия по количеству макро и микроутечек в нормальных тканях и опухолевых?
2. Известно, что в организме млекопитающих встречаются 3 типа капилляров: непрерывные (соматические), фенестрированные (окончатые), перфорированные (синусоидные). Какие типы капилляров выявляются в злокачественных опухолях и как распространенность микро- и макроутечек наночастиц в них зависит от типа капилляров?

Заключение

На основании вышеизложенного можно сделать заключение, что диссертация Науменко Виктора Алексеевича «Механизмы трансэндотелиального переноса частиц наноразмерного диапазона в микроциркуляторном русле опухолей», представленной на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальностям 1.5.4. Биохимия, 1.5.22. Клеточная биология является научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований осуществлено решение научной проблемы - изучение механизмов доставки и противоопухолевой активности наночастиц и онколитических вирусов с использованием метода интравитальной микроскопии. Полученные результаты имеют важное значение для биохимии, клеточной биологии, патологической физиологии и онкологии при разработке новых методов лечения и диагностики злокачественных опухолей с использованием нанопрепаратов и онколитических вирусов, а также для дальнейших научных исследований и получения новых знаний. Разработаны

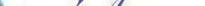
Диссертационная работа полностью соответствует требованиям п. 9 «Положение о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 г. (с изменениями в редакции постановлений правительства Российской Федерации №335 от 21.04.2016г., №748 от 02.08.2016г., № 650 от 29.05.2017г., № 1024 от 28.08.2017г., № 1168 от 01.10.2018г.), а ее автор, Науменко Виктор Александрович, достоин присуждения искомой степени доктора медицинских наук по специальностям 1.5.4. - Биохимия и 1.5.22 - Клеточная биология

ФГБНУ «НИИ морфологии человека имени академика А.П. Авцына»

Ашкарот

«25» 01 2022 г.

e-mail: makarov.olga2013@yandex.ru

Ученый секретарь ИТ БНУ «НИИ морфологии человека имени академика
А.П. Авцына»  Вандышева Р. А.

Вандышева Р. А.

