

ОТЗЫВ

официального оппонента

доктора биологических наук Заботиной Татьяны Николаевны на диссертацию Даниловой Анны Борисовны «Изучение механизмов «уклонения» опухолевых клеток от иммунного надзора в контексте разработки современных методов активной специфической иммунотерапии», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальностям 3.1.6. Онкология, лучевая терапия, 3.2.7. Иммунология

Актуальность темы диссертационного исследования

Начало тысячелетия ознаменовалось бурным развитием и внедрением в клиническую практику биологических и, в частности, иммунотерапевтических подходов лечения в онкологии. Это стало возможным благодаря 50-летним фундаментальным исследованиям именно в иммунологии. Открытие иммунной функции тимуса, Т-клеток и иммунного надзора заложило основу для современных целенаправленных иммунных вмешательств, которые наряду с хирургией, лучевой и химиотерапией, занимают достойное место в терапевтическом арсенале лечения пациентов со злокачественными новообразованиями.

Однако повышенное ожидание от иммунотерапии и ее невысокая противоопухолевая эффективность (10-30%) требует дальнейших исследований, позволяющих лучше понять молекулярную и биологическую природу взаимоотношения злокачественных опухолей и иммунной системы.

За последние десятилетия существенно изменились представления о процессе онкогенеза, при котором злокачественное новообразование рассматривают не как обусловленное исключительно возникновением генетических мутаций, а, скорее, как сложную высокоструктурированную «экосистему», содержащую опухолевые клетки, различные типы нормальных клеток и измененный васкуляризированный внеклеточный матрикс. Не вызывает сомнений существование сложного реципрокного взаимодействия между клеточными элементами иммунной системы и малигнизированными

клетками, и реализация клетками опухоли множественных механизмов, позволяющих избежать элиминирующего воздействия клеток-эффекторов.

Углубленное изучение механизмов взаимодействия клеток иммунной системы с опухолевым микроокружением, приобретает все большее значение в контексте персонализации противоопухолевой терапии, в том числе активной специфической клеточной иммунотерапии. Исследования свойств малигнизированных клеток важно также для преодоления первичной и приобретенной в ходе терапевтического воздействия иммунорезистентности, которая остается серьезным препятствием при использовании современных методов противоопухолевой иммунотерапии. В этом контексте изучение особенностей поведения опухоли и ее взаимодействия с компонентами иммунной системы дает возможность определения новых мишеней для разработки иммунотерапевтических стратегий.

Таким образом, данная диссертационная работа, целью которой явилось изучение закономерностей биологической изменчивости свойств злокачественных клеток, способствующих опухолевой прогрессии, и их экспериментальное обоснование как основа для развития перспективной методологии создания клеточных противоопухолевых вакцин, представляет собой крайне своевременное и актуальное научное исследование.

Достоверность и научная новизна исследования

Научная новизна диссертационной работы Даниловой А.Б. не вызывает сомнений и обоснована тем, что автором создана уникальная коллекция охарактеризованных индивидуальных клеточных линий меланомы кожи (МК), сарком мягких тканей и остеогенных сарком (СМТ/ОС) и опухолей эпителиального происхождения (ЭО), которые могут быть использованы в качестве экспериментальных моделей в доклинических исследованиях. При изучении антигенного фенотипа опухолевых клеток в процессе длительного культивирования автором обнаружено сходство антигенных изменений в клетках МК, СМТ/ОС, ЭО, характеризующихся уменьшением презентации опухолеассоциированных антигенов (ОАА) и

антигенов главного комплекса гистосовместимости I класса, появлением антигенов HLA II класса, усилением пролиферативных и инвазивных свойств, что соответствует эволюционным изменениям, наблюдаемым в опухоли *in vivo*.

Выявлена способность культивируемых клеток солидных опухолей синтезировать и секретировать в окружающую среду широкий спектр иммуносупрессивных факторов (ИСФ), которая более выражена при длительном культивировании, а секреторные функции культивируемых опухолевых клеток, связанных с формированием иммуносупрессивного микроокружения зависят от пространственной организации клеточной модели *in vitro*. Автором также установлено сходство профиля экспрессии раково-тестикулярных генов (РТГ) в клетках солидных опухолей разного гистогенеза, что позволяет использовать культивируемые клетки МК как источник раково-тестикулярных антигенов (РТА) в клеточной иммунотерапии. Разработан и создан новый универсальный клеточный продукт для нагрузки и активации ДК *in vitro*. Кроме того, созданы и запатентованы опухолевые клеточные линии и способы их применения как клеточные модели в разработке методов оценки поствакцинального клеточного иммунитета, в том числе позволяющих визуализировать процесс киллинга и выживаемости клеток солидных опухолей после взаимодействия с цитотоксическими лимфоцитами *in vitro*, провести количественный и качественный анализ эффективности этого взаимодействия.

Автором обнаружена высокая предиктивная и прогностическая ценность данных о продукции культивируемыми опухолевыми клетками ИСФ для клеточной иммунотерапии, что позволяет их использовать в качестве прогностических и предиктивных факторов, которые могут применяться при планировании лекарственного лечения.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Результаты, полученные в ходе выполнения диссертационной работы Даниловой А.Б., носят как фундаментальный, так и прикладной характер.

Созданная коллекция охарактеризованных клеточных культур солидных опухолей стала неотъемлемой частью Банка биологических образцов однотипно пролеченных больных ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, существование которого значительно расширяет возможности проведения доклинических исследований. Получены свидетельства интеллектуальной собственности на создание и применение клеточных линий опухолей различного гистогенеза.

Обнаруженные общие закономерности эволюции антигенного профиля и метаболических особенностей клеток солидных опухолей в процессе длительного культивирования, зависимость секреторных свойств малигнизированных клеток от пространственной организации модели позволяют более адекватно подходить к вопросу клеточного моделирования с целью создания условий, максимально приближенных к реальной клинической ситуации.

Данные о сходстве профиля экспрессии РТГ клетками различных солидных опухолей позволили разработать клеточные модели, с помощью которых была показана принципиальная возможность универсального использования лизатов культивируемых клеток МК для нагрузки и активации ДК. Создан и запатентован для внедрения в клиническую практику новый клеточный продукт для активации вакцинных ДК.

Взаимосвязь экспрессии генов *PRAME*, *PASD1*, *SSX1* и продукции ИСФ, таких как интерлейкины (IL) IL-6, IL-8, IL-10, TGF- β 1, MICA, VEGF, с инвазивным потенциалом опухолевых клеток и реализацией феномена «ускользания» от воздействия клеток-эффекторов позволяет рассматривать эти факторы как новые мишени для терапевтических технологий, имеющих целью воздействовать на метастатическую болезнь.

Обнаруженная прогностическая и предиктивная значимость продукции ИСФ культивируемыми опухолевыми клетками пациентов позволит использовать установленные закономерности как критерий выбора способа

клеточной иммунотерапии для пациентов со злокачественными новообразованиями.

Вместе с тем, обнаруженные автором закономерности эволюции свойств опухолевых клеток в культуре, интересны с теоретической точки зрения, так как расширяют наши представления о биологии злокачественных новообразований.

Степень обоснованности научных положений, выводов, рекомендаций

Достоверность и обоснованность полученных результатов обеспечена тщательной теоретической проработкой проблемы, достаточным объемом изученного материала (исследование основано на биологическом материале 826 пациентов: образцы опухолевой ткани (826), супернатанты культур нормальных и опухолевых клеток (1912), образцы периферической крови пациентов (84), фракции клеток крови после лейкофереза (32), применением комплекса современных методов исследования, использованием обработки полученных данных с использованием современных методов статистического анализа. Автором лично проведено выделение культивирование клеток МК, СМТ/ОС, ЭО, все экспериментальные и клинические части работы, морфологические, иммуноцито- и гистохимические, цитофлуорометрические исследования, иммуноферментный, мультиплексный анализ, анализ данных молекулярно-генетических исследований, статистическая обработка результатов.

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. Практические рекомендации, сформулированные на основании полученных результатов и выводов, могут быть использованы в дальнейших экспериментальных и клинических исследованиях.

По теме диссертации опубликовано 75 печатных работ, из них 29 статей в журналах, рекомендованных ВАК Министерства науки и высшего образования Российской Федерации для публикации основных результатов диссертаций на соискание ученой степени доктора биологических наук, из которых 27 — в изданиях международной реферативной базы данных и системы цитирования. Получено 13 патентов на изобретение РФ, два свидетельства о регистрации баз данных. Подготовлено одно учебное пособие для обучающихся в системе высшего и дополнительного профессионального образования. Результаты диссертационной работы были неоднократно доложены на российских и международных конференциях.

Объем и структура диссертации, оценка ее завершенности в целом

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, главы «Материалы и методы», где описаны применяемые автором методики, главы по результатам собственных исследований и обсуждения полученных результатов, которая состоит из семи разделов, заключения, выводов, практических рекомендаций, раздела «Перспективы разработки темы», списка сокращений и списка литературы.

Библиографический указатель включает 832 источника, из которых 818 – на английском языке. Объем диссертации – 368 стр., текст иллюстрирован 45 таблицами и 84 рисунками.

Во введении автор дает обоснование актуальности исследования, освещает 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. Также во введении представлены данные о внедрении результатов исследования, о личном вкладе автора в представленную работу, соответствие диссертации паспорту научных специальностей, практические рекомендации и перспективы дальнейших исследований по данной тематике.

В главе 1 (обзор литературы) автор излагает современные представления об особенностях функционирования иммунной системы в условиях опухолевого роста. Автор подробно рассматривает концепцию иммунного «редактирования» опухоли, уделяя особенное внимание феномену «ускользания» опухоли от иммунного надзора, тем механизмам, которые используют опухолевые клетки для формирования микроокружения, благоприятного для их пролиферации и диссеминации, известным на сегодняшний день.

Обзор литературы занимает 57 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» (39 стр.) представлено описание материала исследования и подробно охарактеризованы методы, которые автор использовал в своей диссертационной работе. В исследование включен биологический материал 826 больных злокачественными новообразованиями различного гистогенеза: образцы опухолевой ткани, супернатанты культур нормальных и опухолевых клеток, образцы периферической крови, компоненты крови после лейкофереза. Дана подробная клиническая характеристика больных, включенных в исследование ИСФ, продуцируемых культивируемыми опухолевыми клетками как возможных прогностических и предиктивных факторов, влияющих на прогноз заболевания и эффективность клеточной иммунотерапии. Автор использовала широкий спектр методов для достижения задач, поставленных в исследовании. Все методы систематизированы и подробно описаны. Были использованы методы культивирования клеток, иммуноферментного и мультиплексного анализа, иммуноцито- и гистохимии, проточной цитофлуорометрии, молекулярно-генетические методы. В данном разделе описаны также методы построения экспериментальных клеточных моделей для изучения свойств малигнизированных клеток в трехмерной системе культивирования и влияния на активность и подвижность клеток иммунной системы.

Статистическая обработка данных была выполнена с использованием с использованием программы IBM SPSS 23, R v.3.5.2. Для проведения иерархического кластерного анализа, результаты которого визуализировали в формате тепловой карты, был использован программный пакет «gplots» (v. 3.0.1.1). Объем изученного материала и избранные методы статистической обработки не вызывают сомнений в значимости и достоверности полученных результатов.

Третья глава (201 стр.) содержит семь разделов и посвящена результатам собственных исследований и их обсуждению.

Автором создана коллекция культур клеток солидных опухолей, куда вошли клеточные линии МК, СМТ/ОС и опухолей эпителиального происхождения, таких как рак почки, колоректальный рак, рак молочной железы и рак яичников. Созданная коллекция явилась базой для проведения последующих исследований антигенных, метаболических свойств злокачественных клеток, их миграционного и инвазивного потенциала, а также на базе этой коллекции были получены путем длительного культивирования 110 клеточных линий опухолей различного гистогенеза, которые явились основой для создания клеточных моделей, что нашло отражение в 12 патентах РФ.

В процессе культивирования автором был изучен антигенный фенотип клеток МК и установлено, что метастатические клетки МК характеризуются более выраженной презентацией антигенов HLA DP/DQ/DR, меньшим количеством S100+-клеток ($p < 0,05$), усилением пролиферативной активности, а также повышенной транскрипционной активностью РТГ *MAGEA1* и *SLLP1*. При длительном культивировании только 4,61% клеточных линий МК сохраняют стабильно воспроизводимый специфический антигенный профиль.

При этом было показано, что процесс антигенной изменчивости имеет отсроченный характер, и на ранних пассажах (≤ 10) клетки солидных опухолей сохраняют антигенные свойства исходной ткани пациентов, что

позволяет их использовать как экспериментальные модели для решения задач, приближенных к реальной клинической практике. Данный раздел, посвященный изучению антигенной презентации опухолевыми клетками, выполнен с помощью методов иммуноцитологических и гистохимических методов и корректно иллюстрирован.

Для изучения экспрессии РТГ автор выбрал панель из одиннадцати наиболее часто встречающихся РТА. Этот выбор основан на представлении, стимулирующее иммунный ответ против одного члена семейства будет способствовать распознаванию и элиминации клеток, экспрессирующих родственные антигены. Даниловой А.Б. был обнаружен факт сходства профилей экспрессии 10 РТГ клетками МК, СМТ/ОС и злокачественных новообразований эпителиального происхождения, который позволил предполагать возможность использования лизатов культивируемых клеток МК как источник РТА в клеточной иммунотерапии на основе активированных ДК. В результате этой части исследований был создан новый клеточный препарат для нагрузки и активации ДК на основе равных долей лизатов 9 клеточных линий МК, обладающих гиперэкспрессией 10 РТГ, получен патент РФ.

В диссертационном исследовании были изучены супернатанты культур опухолевых клеток на предмет присутствия более 80 анализов, представляющих собой факторы роста, цитокины, хемокины и другие биологически активные молекулы, что позволило установить факт повышенной продукции культивируемыми клетками солидных опухолей факторов, ассоциированных с иммуносупрессией, ангиогенезом, инвазией, метастазированием, при этом количественные характеристики секреторного профиля были ассоциированы с типом опухоли. Процесс длительного культивирования (>20 пассажа) был сопряжен с усилением секреторной активности опухолевых клеток в отношении лиганда MICA, TGF- β 1, цитокина IL-10, независимо от типа злокачественного новообразования. Кроме того, было обнаружено, что пространственная организация клеточной

модели *in vitro* оказывает влияние на секреторные функции культивируемых клеток солидных опухолей, связанных с формированием микроокружения, благоприятного для пролиферации и метастазирования.

Изучение процессов миграции и инвазии опухолевых клеток позволило установить, что инвазивный потенциал 2D-культивируемых клеток МК и СМТ/ОС коррелирует с экспрессией РТГ *PRAME*, *PASD1*, *SSX1*, продукцией факторов HB-EGF, IGFBP, PLGF, PECAM-1, FST, SCF, IL-8. Существует зависимость изменения скорости инвазии опухолевых клеток в 3D-модельной системе, включающей стромальный компонент, от продукции факторов IL-8, HGF, SCF, FST, Prolactin, PECAM-1. Автор делает вывод, что данные факторы можно рассматривать как новые мишени для терапевтических технологий, имеющих целью воздействовать на метастатическую болезнь.

Автором была создана клеточная модель кокультивирования созревающих ДК с клетками МК разных пациентов и установлено, что продукция клетками МК TGF- β 1, IL-10, VEGF-A, EGF, FGF, HGF, sFASL ингибирует скорость движения ДК в аналитической системе *in vitro* Cell-IQ, то есть опухолевые клетки способны менять свойства ДК под влиянием синтезируемых ИСФ. Также в эксперименте было установлено, что ДК, активированные РТА+-лизатами клеток МК, способны генерировать цитотоксические Т-лимфоциты (ЦТЛ), реактивные по отношению к РТА+-клеткам других опухолей, при этом эффективность взаимодействия ЦТЛ и клеток-мишеней зависит от транскрипционной активности генов *PRAME* и *PASD1*, а также от продукции клетками солидных опухолей целого спектра факторов IL-6, IL-8, IL-10, TGF- β 1, MICA, VEGF. С помощью этих экспериментов автору удалось показать принципиальную возможность универсального подхода к использованию ДК-вакцинотерапии, базирующейся на данных об экспрессии РТА.

Основываясь на полученных экспериментальных данных, автор выдвигает гипотезу, что метаболические свойства клеток злокачественных

новообразований, позволяющие создавать микроокружение, которое благоприятствует дальнейшей диссеминации опухоли в организме, являются универсальным механизмом, способным существенно ограничивать клиническую эффективность клеточной иммунотерапии. Изучение четырех ИСФ, синтезируемых опухолевыми клетками пациентов, позволило выявить факт высокой предиктивной и прогностической ценности продукции малигнизированными клетками этих ИСФ для специфической клеточной иммунотерапии. Автором подтверждена принципиальная возможность использования свойств культивируемых опухолевых клеток пациента в качестве прогностических и предиктивных факторов, которые могут применяться для планирования лекарственного лечения.

Каждый раздел «собственных результатов исследования» сопровождается подробным обсуждением, которое содержит анализ результатов проведенного исследования и сопоставление полученных собственных данных с опубликованными в научной литературе, где автор демонстрирует свободное владение материалом.

Необходимо отметить скрупулезность автора в планировании работы в соответствии с поставленными задачами и тщательность выполнения, что дает возможность высоко оценить диссертационное исследование Даниловой А.Б.

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

Практические рекомендации соответствуют выводам и основным положениям проведенного исследования.

Материалы диссертации полностью отражены в автореферате, который соответствует требованиям ВАК РФ.

Рекомендации по использованию результатов диссертационной работы

Результаты диссертационного исследования, связанные с выявлением особенностей изменений свойств клеток солидных опухолей *ex vivo*, связанных с «уклонением» от иммунного надзора, расширяют представления

об адаптационных возможностях и пластичности клеток злокачественных новообразований и могут дополнить сведения, включенные в образовательные программы высших учебных учреждений соответствующего профиля. Клеточные линии опухолей различного гистогенеза, полученные в диссертационной работе, могут служить базой для доклинических испытаний, а также как релевантные клеточные модели для разработки диагностических систем и биомедицинских клеточных препаратов различного назначения. Закономерности, выявленные в ходе исследования, могут быть использованы при разработке новых стратегий в терапии злокачественных новообразований.

Уровень продукции ИСФ культивируемыми клетками солидных опухолей пациентов может применяться как критерий показаний или противопоказаний при назначении клеточной иммунотерапии и оценки риска прогрессирования заболевания.

Вопросы и замечания

Принципиальных замечаний по существу и оформлению работы нет.

Заключение


Диссертационная работа Даниловой Анны Борисовны «Изучение механизмов «уклонения» опухолевых клеток от иммунного надзора в контексте разработки современных методов активной специфической иммунотерапии», представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальностям 3.1.6. Онкология, лучевая терапия, 3.2.7. Иммунология является самостоятельной завершенной научной квалификационной работой, в которой на основании полученных автором результатов осуществлено решение актуальной научной проблемы, имеющей значение для развития онкологии и иммунологии, заключающейся в установлении закономерностей биологической изменчивости свойств малигнизированных клеток, способствующих опухолевой прогрессии, что вносит дополнительный вклад в разработку концепции взаимоотношений

опухоли и иммунной системы в процессе прогрессирования злокачественных новообразований.

По своей актуальности и новизне, объему выполненных исследований, их теоретической и практической значимости, а также достоверности полученных результатов и обоснованности выводов диссертационная работа Даниловой А.Б. полностью соответствует требованиям ВАК РФ к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук в п.9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 (в редакции постановления Правительства Российской Федерации от 21.04.2016 г. № 335, от 02.08.2016 г. № 748, от 29.05.2017 г. №650, от 28.08.2017 г. № 1024, от 01.10.2018 г. № 1168, от 11.09.2021 г. №1539), а ее автор Данилова Анна Борисовна заслуживает присуждения ей искомой степени доктора биологических наук по специальностям 3.1.6. Онкология, лучевая терапия, 3.2.7. Иммунология.

Официальный оппонент:

заведующий лабораторией клинической иммунологии и инновационных технологий
Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
доктор биологических наук


«23 » октября 2023 г.

Т.Н. Заботина

Подпись д.б.н. Т.Н. Заботиной «заверяю»

Ученый секретарь ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, к.м.н.



 И.Ю. Кубасова

Адрес организации: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени

Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Российская Федерация, 115522, г. Москва, Каширское ш., д. 24

сайт: <https://www.ronc.ru>, E-mail: info@ronc.ru, тел. +7 (499) 444-24-24

Адрес электронной почты: tatzabotina@yandex.ru