

Отзыв официального оппонента

доктора медицинских наук, профессора, академика РАН Козлова Владимира Александровича на диссертационную работу Ефремовой Натальи Александровны «Изучение селекции опухолевых клеток метастатических сарком мягких тканей и остеогенных сарком для прогноза течения заболевания и эффективности терапии», представленную на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям: 3.1.6. Онкология, лучевая терапия и 3.2.7. Аллергология и иммунология

Актуальность темы диссертации

Согласно анализу онкологической заболеваемости, саркомы составляют около 1% от всех новообразований, но из-за быстрого инвазивного роста занимают одно из ведущих мест по смертности среди больных злокачественными опухолями. Недостаточная эффективность терапии у пациентов с метастатическими саркомами подчеркивает необходимость проведения новых исследований для выявления перспективных мишеней, совершенствования доклинических моделей, прогнозирования лекарственного ответа. Очевидно, что эти подходы должны базироваться на углубленном изучении биологии сарком. Понимание процессов, происходящих в опухоли при метастатическом характере заболевания может оказать значительное влияние на исход терапии. Экспериментальные модели *in vitro* являются ценным материалом для изучения эволюции злокачественных новообразований, и клеточные линии опухолевых клеток позволили сделать множество ценных наблюдений для понимания онкогенеза. Однако при длительном культивировании, с течением времени накопление эпи-/генетических мутаций может оказывать влияние на результаты экспериментов по изучению влияния различных лекарственных композиций. Использование опухолевых культур, полученных непосредственно от пациентов и не подвергнутых длительному культивированию позволяет сохранить наиболее релевантные мутации. В этой связи диссертационная работа, направленная на поиск новых биомаркеров прогноза течения заболевания и эффективности терапии у больных метастатическими

саркомами мягких тканей и остеогенными саркомами на основе изучения особенностей селекции опухолевых клеток *ex vivo*, является важным и актуальным направлением исследований биологии злокачественных новообразований, практической онкологии и иммунологии.

Степень обоснованности и достоверности научных положений и выводов, сформулированных в диссертации

Представленная диссертационная работа выполнена на современном научно-методическом уровне. Множество использованных методик и большой объем проведенных исследований позволил автору успешно реализовать поставленные исследовательские задачи и сформулировать полноценные выводы. На достаточном экспериментальном материале автором проведено изучение клоногенного потенциала самостоятельно полученных клеточных линий сарком. При моделировании эволюционных процессов, происходящих в опухолях установлено, что увеличение пролиферативной активности и химиорезистентности клеток наблюдается в процессе длительного культивирования (>15 пассажей) и клонирования. В результате проведенной работы автором обнаружено, что клоногенные и неклоногенные клеточные линии сарком имеют статистически значимые различия в миграционной способности, экспрессии ALDH1 (маркера стволовых клеток опухоли), транскрипционной активности раково-тестикулярных генов. У пациентов, из образцов опухоли которых были получены клоногенные клеточные линии, в периферической крови автором было выявлено сниженное количество цитотоксических Т-лимфоцитов, активированных форм цитотоксических Т-лимфоцитов, Т-лимфоцитов хелперов и высокое содержание НК-клеток, что свидетельствует об изменении поляризации иммунного ответа в процессе опухолевой селекции. Клоногенность клеток опухоли оказывала влияние на общую выживаемость пациентов как в основной группе, так и среди получавших иммунотерапию вакциной «СаТеVac». Таким образом, клоногенность культур клеток сарком может

рассматриваться в качестве прогностического фактора неблагоприятного прогноза заболевания и предиктора низкой эффективности иммунотерапии вакциной «CaTeVac».

Достоверность полученных результатов определяется репрезентативностью выборки (в исследование скринировано 95 образцов опухоли пациентов, включено 56 клеточных линий и 83 клон), использованием современных исследовательских методик. Для статистической обработки полученных данных применялись как методы непараметрической так и параметрической статистики. Все это позволило решить поставленные задачи, концептуально обосновать положения, выносимые на защиту и получить достоверные выводы, вытекающие из результатов исследования. На их основе сформулированы практические рекомендации, доступные к реализации. Полученные автором результаты исследований доложены на российских и международных конференциях, опубликованы в реферируемых изданиях.

Достоверность и новизна научных положений, выводов и рекомендаций

Научные положения диссертационного исследования Ефремовой Н.А. обоснованы, достоверны, содержат признаки новизны. Благодаря проведенному исследованию, удалось получить и охарактеризовать новые клеточные линии сарком, а также их клоны, которые могут быть использованы в экспериментальном моделировании процессов, происходящих в опухолях с высокой внутриопухолевой гетерогенностью и в доклинических исследованиях новых терапевтических молекул. Культуры, полученные путем клонирования, могут рассматриваться как клеточные модели опухолей с высоким метастатическим потенциалом. Установлено, что клоногенность культур клеток может являться прогностическим фактором, определяющим течение заболевания. Обнаружена связь между экспрессией раково-тестикулярных генов и клоногенностью культивируемых клеток: клетки клоногенных опухолей отличаются выраженной транскрипционной

активностью генов *GAGE1* и *SLLP1* ($p < 0,05$). Выявлена экспрессия генов *PASD1* и *SLLP1*, ранее неизвестная в миксофибросаркомах и остеогенных саркомах. Найдена зависимость клоногенного потенциала культивируемых клеток сарком от процентного содержания $ALDH1^+$ клеток.

Основные положения диссертации отражены в 19 публикациях, из них 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ, 13 работ в сборниках трудов российских и международных конференций. По результатам исследования автором получено 3 патента и свидетельство о регистрации базы данных. Подготовлено учебное пособие для обучающихся в системе высшего и дополнительного профессионального образования.

Значимость для науки и практики полученных автором результатов

Рассматриваемая диссертационная работа расширила теоретические знания о биологии сарком, что дает предпосылки для создания новых иммунотерапевтических подходов в лечении этих заболеваний. Полученные 56 клеточных линий сарком мягких тканей и остеогенных сарком, 83 дочерних клона могут быть использованы для экспериментального моделирования процессов, происходящих в опухолях с высокой внутриопухолевой гетерогенностью. Такие факторы, как наличие клоногенности опухоли, экспрессия раково-тестикулярных генов *GAGE1* и *SLLP1*, высокая активность фермента $ALDH1$, низкое содержание цитотоксических Т-лимфоцитов, активированных форм цитотоксических Т-лимфоцитов и Т-лимфоцитов хелперов, высокое содержание НК-клеток в периферической крови пациентов, могут рассматриваться в качестве факторов, определяющих неблагоприятный прогноз и предикторов низкой эффективности иммунотерапии вакциной «CaTeVac» при метастатических саркомах.

Структура и содержание диссертации

Диссертация Ефремовой Н.А. изложена на 134 страницах машинописного текста и оформлена в соответствии с требованиями ВАК

Министерства образования и науки Российской Федерации. Работа построена по традиционному плану, иллюстрирована 38 рисунками и 13 таблицами, содержит ссылки на 166 источников литературы, более 50% из них опубликованы в течение последних 5 лет.

Во введении автор раскрывает актуальность проблемы, излагает научную новизну и практическую значимость работы, формулирует положения, выносимые на защиту, цель и задачи исследования.

В первой главе представлен обзор научной литературы, в котором автор анализирует современные представления об эволюции опухолей и клональной опухолевой селекции вызванной терапевтическим воздействием. Подробно описаны существующие эволюционные модели и методы, используемые для их изучения. Обзор литературы исчерпывающий, написан литературным языком, демонстрирует глубокое понимание автором исследуемого вопроса и свидетельствует об умении работать с научной литературой.

Во второй главе представлены материалы и методы исследования. В качестве моделей автором использованы клеточные линии, полученные из интраоперационных опухолевых образцов, а также клонированные опухолевые культуры. Выявление взаимосвязи между клоногенностью и клиническими характеристиками базируется на анализе данных пациентов, из опухолевого материала которых были выделены клеточные линии. Кроме того, выполнен субпопуляционный анализ иммунологических показателей периферической крови пациентов, которые получали иммунотерапию на основе аутологичных дендритных клеток, активированных высокоиммуногенными раково-тестикулярными антигенами в ФГБУ НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова Минздрава России. Достоверность полученных результатов подтверждена репрезентативностью выборки и корректным использованием статистических методов.

Третья глава посвящена анализу результатов исследования. Автор представляет подробное описание полученных клеточных линий сарком, их характеристики и результаты клонирования методом предельных разведений.

Проведен сравнительный анализ клоногенных и неклоногенных клеточных линий. Обнаружена связь клоногенности с химиорезистентностью, миграционной и пролиферативной активностью, экспрессией ALDH1, транскрипционной активностью раково-тестикулярных генов. Выявлены значимые различия общей выживаемости пациентов с клоногенными и неклоногенными клеточными линиями сарком. Определена зависимость изменений иммунологических показателей периферической крови от клоногенности опухолевых клеток у пациентов с саркомами мягких тканей и остеогенными саркомами. Глава «Результаты» хорошо иллюстрирована, содержит достаточное количество таблиц и графиков.

В четвертой главе автором представлено детальное обсуждение результатов диссертационного исследования в сравнении с данными, опубликованными в отечественных и зарубежных научных изданиях, что дает основания для формирования полноценных выводов.

Выводы полностью соответствуют задачам исследования и следуют из полученных результатов. Выводы достоверны, корректно сформулированы, статистически достоверны и являются основой для практических рекомендаций. Практические рекомендации вытекают из полученных результатов и могут быть использованы в клинической и научно-педагогической деятельности.

Материал в автореферате представлен логично и последовательно. Стиль изложения материала, иллюстрированного таблицами и рисунками, сопровождаемого кратким и емким описанием использованных методик, позволяет получить из автореферата исчерпывающую информацию о сути и результатах диссертационного исследования.

Критических замечаний по существу и оформлению диссертационной работы, нет. Немногочисленные стилистические неточности и опечатки не снижают ценность диссертационного исследования и не сказываются на общей положительной оценке представленной работы.

Заключение

Диссертационная работа Н.А. Ефремовой «Изучение селекции опухолевых клеток метастатических сарком мягких тканей и остеогенных сарком для прогноза течения заболевания и эффективности терапии» представляет собой самостоятельное законченное научное исследование, выполненное по актуальной проблеме современной онкологии и иммунологии, полностью соответствует требованиям ВАК РФ к диссертациям на соискание ученой степени кандидата 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), а ее автор – Ефремова Н.А. заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям 3.1.6 – онкология, лучевая терапия (медицинские науки) и 3.2.7 – аллергология и иммунология (медицинские науки).

Официальный оппонент:

доктор медицинских наук, профессор, академик РАН,
научный руководитель Федерального
государственного бюджетного научного учреждения
«Научно-исследовательский институт фундаментальной
и клинической иммунологии»

«01» декабря 2022 г.

Козлов Владимир Александрович

Согласен на сбор, обработку, хранение и передачу моих персональных данных

«01» декабря 2022 г.

Козлов Владимир Александрович

Подпись д.м.н. профессора Козлова В.А. «заверяю»:

Ученый секретарь «Научно-исследовательского
института фундаментальной и клинической иммунологии»

к.б.н.

Гаврилова Елена Давидовна

ФГБНУ "НИИ фундаментальной и клинической иммунологии" : 630099,
г.Новосибирск, ул. Ядринцевская, д. 14, Тел. +7(383) 222-26-74, факс +7(383)
222-70-28, e-mail: info@niikim.ru