

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора медицинских наук, профессора, академика РАН, Кушлинского Николая Евгеньевича на диссертацию Ефремовой Натальи Александровны «Изучение селекции опухолевых клеток метастатических сарком мягких тканей и остеогенных сарком для прогноза течения заболевания и эффективности терапии», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.1.6 – онкология, лучевая терапия (медицинские науки) и 3.2.7 – аллергология и иммунология (медицинские науки)

Актуальность темы выполненной работы

Злокачественные новообразования мягких тканей и костей – относительно редкое явление, хотя в целом по России ежегодно регистрируется более 3,5 тыс. новых случаев. Однако, эти опухоли имеют, как правило, крайне агрессивный характер роста, что ассоциировано с высокой смертностью, ежегодный прирост которой составил за последние 10 лет 0,38%.

Долгое время единственным вариантом лечения больных с саркомами являлся хирургический метод, который остается наиболее распространенным и в настоящее время. Удаление саркомы мягких тканей в пределах ее псевдокапсулы сопровождается рецидивированием опухоли приблизительно у 90% больных, при широком местном иссечении опухоли отмечается 40% частота рецидивов. Современные терапевтические стратегии, использующие таргетные и иммунологические препараты, значительно улучшили выживаемость пациентов с саркомами, тем не менее, прогноз для больных с метастатическим характером заболевания по-прежнему остается неблагоприятным.

Саркомы мягких тканей и костей характеризуются крайней степенью клинической и биологической гетерогенности. В настоящее время насчитывают более 100 гистологических подтипов сарком, развитие молекулярно-генетических методов позволило продвинуться в

изучении биологии этих злокачественных новообразований, что дало возможность изменить стратегии диагностики и разработать новые подходы к лечению. В некотором смысле, саркомы стали эталонной трансляционной моделью в онкологии для использования полученных в результате исследований биологических и молекулярных данных в реальной клинической практике.

Понимание процессов опухолевой прогрессии, тех эволюционных изменений в опухоли, которые происходят под влиянием различных факторов, в том числе под влиянием терапии, когда происходит целенаправленный отбор наиболее резистентных опухолевых клонов, необходимо для создания более эффективных способов лечения. Здесь на первый план выступают исследования с использованием различных модельных систем *in vitro*. Однако, для сарком при всей их гетерогенности получено сравнительно малое количество хорошо охарактеризованных клеточных линий, что существенно тормозит развитие новых подходов к терапии этого заболевания.

Использование опухолевых клеток, выделенных из организма человека, позволяет преодолеть этические ограничения, проводить исследования на идентичном материале в строго контролируемых условиях окружающей среды, длительно наблюдать малигнизированные клетки, подвергая их различным воздействиям. Именно поэтому опухолевые клеточные линии остаются ценным материалом для изучения эволюции злокачественных новообразований с целью разработки новых методов воздействия на опухоль и новых лекарственных препаратов.

Таким образом, данная диссертационная работа, целью которой является 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*, представляет собой крайне своевременное и актуальное научное исследование.

Научная новизна исследования

Научная новизна диссертационной работы Ефремовой Н.А. не вызывает сомнений и обоснована тем, что автором создана коллекция из 56 охарактеризованных клеточных линий метастатических СМТ и ОС 16 гистологических подтипов и 83 дочерних клона для клеточного моделирования процессов, происходящих в опухолях с высокой внутриопухолевой гетерогенностью. Установлено, что клоногенность культур клеток СМТ и ОС может рассматриваться в качестве прогностического фактора, определяющего течение заболевания. Обнаружено, что длительное культивирование и клонирование клеток СМТ и ОС приводят к увеличению их пролиферативной активности и химиорезистентности. Культуры, полученные путем клонирования, могут использоваться как клеточные модели опухолей с высоким метастатическим потенциалом. Установлена связь клоногенности культивируемых клеток СМТ и ОС с экспрессией маркера стволовых клеток *ALDH1* и экспрессией раково-тестикулярных генов *GAGE1* и *SLLP1*. Выявлена экспрессия генов *PASD1* и *SLLP1*, ранее неизвестная в миксофибросаркомах и остеогенных саркомах.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Результаты, полученные в ходе выполнения диссертационной работы Ефремовой Н.А., носят как фундаментальный, так и прикладной характер. Созданная коллекция охарактеризованных клеточных линий СМТ и ОС и их дочерних клонов может быть использована для моделирования *in vitro* процессов, происходящих в опухолях с высокой внутриопухолевой гетерогенностью, а клоногенные клеточные линии - как модели резистентности для разработки новых способов лечения сарком.

Клоногенность клеток сарком, полученных из операционных образцов пациентов, может рассматриваться как неблагоприятный фактор прогноза заболевания. Ряд критериев, таких как наличие клоногенности опухоли, экспрессия раково-тестикулярных генов *GAGE1* и *SLLP1*, присутствие $ALDH1^+$ -клеток в опухоли, низкое содержание цитотоксических Т-лимфоцитов, активированных цитотоксических Т-лимфоцитов, активированных Т-лимфоцитов хелперов и высокое содержание NK-клеток в периферической крови пациентов могут быть использованы как предиктивные факторы низкой эффективности иммунотерапии и неблагоприятного прогноза при метастатических саркомах. Выявленная высокая транскрипционная активность РТГ в метастатических саркомах позволяет рассматривать их в качестве перспективных кандидатов для проведения иммунотерапии, направленной против РТА.

Полученные данные о свойствах клеток СМТ и ОС *in vitro* способствуют расширению теоретических знаний о биологии сарком.

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

Достоверность и обоснованность полученных результатов обеспечена тщательной теоретической проработкой проблемы, достаточным объемом изученного материала (в исследовании скринировано 95 образцов опухоли пациентов, включено 56 клеточных линий и 83 клон), применением комплекса современных методов исследования, использованием обработки полученных данных с использованием современных методов статистического анализа, которые можно корректно применять для множественных попарных сравнений, а также дисперсионного анализа при множественной проверке гипотез. Автором лично проведено культивирование клеток сарком мягких тканей и остеогенных сарком, все экспериментальные и клинические части работы, морфологические и цитофлуорометрические

исследования, 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.

Рекомендации по использованию результатов диссертации

Результаты диссертационного исследования, связанные с выявлением особенностей селекции клеток сарком мягких тканей и остеогенных сарком *ex vivo*, 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 сарком, полученные в диссертационной работе, могут служить базой для доклинических испытаний. Закономерности, выявленные в ходе исследования, могут быть использованы при разработке новых стратегий в терапии этого вида злокачественных новообразований.

Оценка структуры и содержания работы

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

Список литературы включает 166 источников, более 50% из них опубликованы в течение последних 5 лет. Объем диссертации – 134 стр., текст проиллюстрирован 38 рисунками и 13 таблицами.

Во введении автор определяет актуальность исследования, 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 и о личном вкладе автора в представленную работу.

В главе 1 (обзор литературы) автор излагает современные представления о клональной эволюции сарком, ее роль в формировании резистентности к различным видам лечения и подробно останавливается на описании существующих моделей эволюции опухолевых клеток, проблеме индуцированной клональной опухолевой селекции, роли стволовых опухолевых клеток в опухолевой селекции. Автор также приводит основные сведения о биологии сарком мягких тканей и остеогенных сарком и касается различий клональной эволюции сарком мягких тканей и сарком костей. В заключительной части обзора литературы автор приводит сведения о терапии сарком в контексте существующей теории клональной эволюции. Обзор литературы занимает 21 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» (19 стр.) находится описание материала исследования и подробно охарактеризованы методы, которые автор использовал в своей диссертационной работе. В исследование включено 95 пациентов с диагнозом саркома мягких тканей или остеогенная саркома и гистологически подтвержденным метастатическим характером заболевания, у которых были получены интраоперационные образцы опухолевого материала. Автор использовал в своей работе методы культивирования клеток,

трехмерного клеточного моделирования, клонирования, световой микроскопии, проточной цитофлуорометрии, оценки жизнеспособности клеток и клеточной пролиферации, полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Объем изученного материала и избранные методы статистического анализа не вызывают сомнений в значимости и достоверности полученных результатов.

В главе 3 «Результаты исследования» (45 стр.) автор представляет этапы выделения и культивирования клеток сарком мягких тканей и остеогенных сарком и отмечает, что стабильные клеточные линии были получены в 56 случаях, что составило 58,9% от общего числа поступивших на исследование образцов опухоли (56/95). В созданной библиотеке клеточные линии были охарактеризованы и описаны с учетом морфологии, пролиферативной активности, миграционной и инвазивной способности, экспрессии антигенов HLA I класса, транскрипционной активности раково-тестикулярных генов, относительного содержания в популяции стволовых опухолевых клеток с экспрессией маркеров CD133 и ALDH1, способности к спонтанной агрегации, формированию трехмерных структур и инвазивному потенциалу в 3D-клеточной системе.

По результатам HLA-типирования доказана аутентичность полученных клеточных линий, показана высокая частота встречаемости аллелей A*02 (75,9%) и A*32 (18,5%). В результате клонирования выявлено 39,3% (22/56) клеточных линий сарком мягких тканей и остеогенных сарком с высоким клоногенным потенциалом и 60,7% (34/56) неклоногенных клеточных линий. Автору удалось установить, что клоны отличаются повышенной пролиферативной активностью и большей резистентностью к воздействию химиопрепаратов по сравнению с исходными клеточными линиями. Затем автор обнаруживает, что имеют место значимые различия биологических свойств клоногенных и неклоногенных клеточных линий сарком мягких

тканей и остеогенных сарком, касающиеся миграционной способности, продукции альдегиддегидрогеназы ALDH1 (маркера стволовых клеток опухоли), транскрипционной активности раково-тестикулярных генов *GAGE1* и *SLLP1*.

Изучение общей выживаемости пациентов, получавших иммунотерапию и у которых были получены клоногенные и неклоногенные клеточные линии сарком, позволило установить, что имеются статистически значимые различия, 6,4 и 28,3 мес., соответственно. Была выявлена зависимость изменений иммунологических показателей периферической крови пациентов от клоногенности опухолевых клеток: абсолютного содержания цитотоксических Т-лимфоцитов, активированных цитотоксических Т-лимфоцитов CD3+CD8+HLA-DR+, активированных Т-лимфоцитов хелперов CD3+CD4+HLA-DR+, NK-клеток CD3-CD16+CD56+.

Глава «Обсуждение», занимающая 15 стр., разделена автором на две части: в первой обсуждается проблема получения и характеристики клеточных линий мягкотканых сарком и сарком костей, во второй представлено обсуждение результатов клонирования полученных клеточных линий сарком и значение этого феномена для оценки биологического поведения опухолей в реальной клинической практике. В целом, имеет место лаконичный, но емкий сравнительный анализ совокупности данных, имеющихся в мировой и отечественной литературе, и результатов, полученных автором диссертационного исследования, что дает основания для формирования полноценных выводов. Рукопись диссертации заканчивается заключением, где автор акцентирует внимание на тех положениях диссертационной работы, которые указывают на необходимость продолжения исследований сарком мягких тканей и остеогенных сарком.

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

Материалы диссертации полностью отражены в автореферате и в достаточном количестве опубликованных работ (19 печатных работ, из них 6 статей: 4 опубликованы в журналах, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ для соискателей ученой степени кандидата медицинских наук, и 2 в международных журналах). По результатам исследований получены три патента на изобретение и одно свидетельство о регистрации базы данных. Подготовлено одно учебное пособие для обучающихся в системе высшего и дополнительного профессионального образования. Основные результаты доложены на семи научных отечественных и международных конференциях.

Принципиальных замечаний по существу и оформлению работы нет.

Заключение

Диссертационная работа Ефремовой Натальи Александровны «Изучение селекции опухолевых клеток метастатических сарком мягких тканей и остеогенных сарком для прогноза течения заболевания и эффективности терапии», представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, является завершенной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной задачи, направленной на выявление ранее неизвестных биологических и иммунологических закономерностей прогрессии сарком мягких тканей и остеогенных сарком с целью улучшения эффективности лечения пациентов с этими злокачественными новообразованиями, имеющей существенное теоретическое и практическое значение для иммунологии и онкологии.

По актуальности избранной темы, поставленным задачам, новизне и значимости полученных результатов, обоснованности научных выводов диссертационная работа Ефремовой Н.А. является самостоятельным и законченным исследованием, в котором решена важная задача по выделению клоногенных характеристик клеточных линий СМТ и ОС и их связи с параметрами выживаемости и

иммунологическими показателями периферической крови больных, из опухолевого материала которых они были получены, и эта работа имеет значение в онкологии и соответствует требованиям ВАК РФ к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук в п.п.9-14 «Положения ВАК МО РФ о порядке присуждения ученых степеней», утвержденным Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. №842 (в редакции Постановлений Правительства РФ от 21.04.2016 № 335, от 02.08.2016 № 748, от 29.05.2017 № 650, от 28.08.2017 № 1024, от 01.10.2018 № 1168, от 11.09.2021 № 1539), а ее автор Ефремова Наталья Александровна заслуживает присуждения искомой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.1.6. Онкология, лучевая терапия (медицинские науки) и 3.2.7. Аллергология и иммунология (медицинские науки).

Официальный оппонент:

заведующий лабораторией клинической биохимии
Федерального государственного бюджетного
учреждения «Национальный медицинский
исследовательский центр онкологии имени Н.Н.
Блохина» Министерства здравоохранения
Российской Федерации, академик РАН, профессор,
доктор медицинских наук по специальности
14.00.14. Онкология, 14.01.02. Эндокринология



Кушлинский Николай Евгеньевич

22.11.2022 г.

Подпись официального оппонента, доктора медицинских наук,
профессора, академика РАН Кушлинского Н.Е. удостоверяю

Ученый секретарь

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России
кандидат медицинских наук — Кубасова Ирина Юрьевна

Адрес учреждения: Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н.
Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации. 115522, Москва,
Каширское шоссе, д. 24. Телефон: 8-499-324-15-20 E-mail: info@ronc.ru