

ОТЗЫВ

Официального оппонента, доктора медицинских наук, профессора, Голенкова Анатолия Константиновича на диссертацию Лыжко Натальи Александровны на тему «Клеточная локализация и функциональные свойства онкобелка PRAME», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.01.02 – онкология.

Актуальность темы диссертации

Программное лечение лейкозов и лимфом с применением комбинированных курсов химиотерапии позволяет добиваться ремиссии у 50% взрослых больных и 80-90% детей. Это, несомненно, является большим достижением, однако уже в начале 21 века сложилось понимание того, что на этом возможности химиотерапии гемобластозов исчерпаны, в связи с чем необходима модернизация лечебного процесса, использование принципов современной трансляционной медицины. Основным условием при этом является ускоренное внедрение фундаментальных открытий и разработок непосредственно в практику лечения больных.

Ярким примером успешного применения принципов трансляционной медицины в гематологии является использование для лечения хронического миелолейкоза препаратов на основе ингибиторов патогенетически значимой для этого заболевания тирозинкиназы BCR-ABL. Самым свежим примером успешного практического применения фундаментальных разработок в гематологии является внедрение методов иммунотерапии, мишенью которых является белок CD19, располагающийся на поверхности В-лимфоцитов человека. Против CD19 разработаны искусственные рецепторы (CAR), которые внедряются в цитотоксические Т-лимфоциты, превращая их в так называемые CAR-T-клетки, обладающие способностью распознавать и уничтожать CD19-

положительные опухолевые В-лимфоциты больных В-клеточными лейкозами и лимфомами. Кроме того, против CD19 разработано искусственное терапевтическое антитело, обладающее двойной специфичностью: оно одной своей половиной закрепляется на белке CD19 на поверхности опухолевого В-лимфоцита, а другой своей частью связывается с белком CD3 на поверхности цитотоксических Т-лимфоцитов, которые в результате этого сближаются с опухолевой клеткой и уничтожают её.

Говоря об иммунотерапии лейкозов нельзя не упомянуть высокую терапевтическую эффективность гуманизированных антител против молекулы CD20 – поверхностного маркера нормальных и малигнизированных В-лимфоцитов. Синтетические (генно-инженерные) химерные моноклональные антитела мыши/человека, обладающие специфичностью к CD20 антигену, называемые Ритуксимабом, успешно применяются для лечения В-клеточных лимфом.

К сожалению, несмотря на то, что противоопухолевая иммунотерапия на основе CAR-T и гуманизированных антител оказалась очень эффективной для лечения В-клеточных лейкозов и лимфом, широкому внедрению таких методов лечения в онкогематологии и онкологии мешает недостаточное число выявленных на поверхности опухолевых клеток подходящих мишеней, против которых эти методы можно применять. Действительно, ведь уже упоминавшиеся CD19 и CD20 являются маркерами и нормальных, и опухолевых В-лимфоцитов. Иммунотерапия, направленная против этих маркеров, приводит к тотальному снижению количества всех В-лимфоцитов, в связи с чем приходится прибегать к использованию серьезной заместительной терапии для того, чтобы компенсировать В-клеточный иммунодефицит.

Собственно опухолевые поверхностно-клеточные удобные маркеры, против которых возможно было бы получить гуманизированные антитела

или CAR-T-клетки, пока ещё не были выявлены. В связи с этим диссертационное исследование Лыжко Натальи Александровны является очень актуальным, так как посвящено изучению такого истинно опухолевого маркера – раково-тестикулярного антигена PRAME, который благодаря находкам соискателя в ближайшей перспективе обещает быть весьма эффективной мишенью для противоопухолевой иммунотерапии онкогематологических заболеваний и солидных опухолей.

Новизна исследования и полученных результатов диссертации

Принципиально новым и важным результатом данного исследования является обнаружение на поверхности опухолевых клеток различного гистологического происхождения положительного сигнала при окрашивании живых и фиксированных цитологических препаратов опухолей оригинальными моноклональными антителами против антигена PRAME. Этот результат не оставляет сомнений в том, что антиген PRAME локализуется не только внутриклеточно, но и на поверхности опухолевых клеток. Следствием этой находки является то, что антиген PRAME может служить мишенью для противоопухолевой иммунотерапии. Автор убедительно показал, что это именно так, при помощи модельных экспериментов *in vitro*, которые впервые продемонстрировали наличие у моноклональных антител против PRAME ингибирующей активности в отношении PRAME-экспрессирующих линий опухолевых клеток K562, NOMO-1, THP1, а также линии эмбриональных фибробластов человека WI38, в которых искусственная экспрессия антигена PRAME была вызвана при помощи внедрения специальной генно-инженерной конструкции.

Изучение дифференциальной экспрессии генов в линиях эмбриональных фибробластов человека WI38 исходно не экспрессирующих антиген PRAME и при искусственно вызванной экспрессии этого антигена при помощи генно-инженерной модификации, позволило обнаружить, что экспрессия PRAME не является

функционально нейтральной, но, напротив, приводит к активации или подавлению экспрессии некоторых генов, изменение работы которых в совокупности влечёт за собой подстёгивание процесса малигнизации.

В данной работе автор впервые использовал для нагрузки дендритных клеток рекомбинантный опухолевый антиген PRAME, обнаружив при этом, что эта манипуляция не токсична для дендритных клеток и, более того, приводит к усилению цитотоксической активности дендритных клеток против клеток опухолей.

Значимость для науки и практики полученных результатов

Несомненно, важным и практически значимым результатом диссертационного исследования Натальи Александровны Лыжко является обнаружение антигена PRAME на поверхности опухолевых клеток и экспериментальное доказательство возможности иммунного воздействия против этого антигена с целью ингибирования пролиферации PRAME-экспрессирующих опухолевых клеток. Этот результат позволит использовать истинно опухолевый антиген PRAME в качестве мишени для иммунотерапии широкого спектра онкогематологических заболеваний и солидных опухолей, в которых, как известно, антиген PRAME активирован очень часто.

Обнаруженная возможность нагрузки дендритных клеток рекомбинантным антигеном PRAME открывает новую возможность для получения дендритно-клеточной вакцины, специфичной против PRAME-экспрессирующих опухолей.

Обнаружение способности экспрессии гена PRAME усиливать опухолевые свойства расширяет теоретические представления о роли раково-тестикулярных антигенов в процессе канцерогенеза.

Обоснованность и достоверность основных положений, результатов и выводов диссертации

Выявленные в ходе работы закономерности не противоречат, а дополняют существующий уровень знаний. Установленные автором научные положения доказаны статистически. Публикации автора представлены в ведущих российских и зарубежных рецензируемых научных изданиях и полностью отражают содержание работы. Результаты работы доложены на отечественных и зарубежных конференциях с онкогематологической, онкологической тематикой, а также на конференциях, посвящённых разработке новых противоопухолевых препаратов.

Оценка содержания диссертации, ее завершенности в целом, замечания по оформлению

Диссертация построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, глав "Материалы и методы", "Результаты", "Обсуждение результатов", заключения, выводов, списка литературы и списка сокращений. Все разделы сбалансированы по количеству страниц и по оформлению соответствуют принятым нормам.

В разделе «Введение» сформулированы общая актуальность темы, цель и частные задачи, представлена научная новизна, практическая и научная ценность, положения, выносимые на защиту, а также подробно описана степень внедрения работы.

В главе 1 «Обзор литературы» на основе тщательного анализа данных научной литературы отражено современное представление о биологических особенностях раково-тестикулярных антигенов (РТА), в том числе антигена PRAME. Материал содержит историческую справку о том, как были открыты РТА. Показано, что РТА были обнаружены благодаря тому, что к ним отсутствует иммунологическая толерантность, поэтому к ним нередко развивается спонтанный клеточный и гуморальный противоопухолевый ответ. В обзоре приведены сведения о возможности

использования и оценке уровня экспрессии РТА PRAME для проведения дифференциальной диагностики некоторых злокачественных неоплазий. В этой главе автор исчерпывающим образом показывает возможности антигена PRAME в качестве основы для создания пептидных и рекомбинантных противоопухолевых вакцин. Данные об известных на сегодняшний день функциональных особенностях антигена PRAME собраны из наиболее значимых и актуальных научных публикаций. В обзоре в достаточной мере описана биология дендритных клеток (ДК) с акцентом на способность ДК оказывать прямое цитотоксическое действие на опухолевые клетки.

Глава «Обзор литературы» написана внятным научным языком, все термины использованы корректно, материал этого раздела диссертации расширяет понимание высокой актуальности диссертационной работы, позволяет установить соответствие данного исследования современному уровню развития онкологической науки и является теоретический и фактологический фундаментом, позволяющим понять и оценить масштаб и значение собственных исследований автора. Замечаний к этому разделу нет.

В главе 2 «Материалы и методы исследования» описаны использованные в исследовании материалы и методы. В работе использовано большое число опухолевых клеточных линий человека и мыши, в том числе эритромиелоидный вариант бластного криза хронического миелолейкоза K562, гистiocитарная лимфома U937, моноцитарный лейкоз THP-1, диссеминированная меланома MelKor, меланома мыши B16F10, эмбриональные фибробласты человека WI38, промоноцитарный лейкоз NOMO-1 с транслокацией t(9;11). Автор исследовал образцы костного мозга и периферической крови 40 больных острыми лейкозами. Это исследование было проспективным, забор образцов осуществлялся на момент постановки диагноза и в процессе лечения больных.

Среди методов, которые автор использовал в данной работе, было много различных протоколов ведения культур суспензионных и прикрепленных к субстрату клеток. Клетки растили в различных объемах, при культивировании дендритных клеток использовали специальные ростовые факторы. Жизнеспособность клеток оценивалась визуально в камере Горяева при окрашивании их с трипановым синим, а также при помощи МТТ-теста. Иммуногистохимическое окрашивание живых и фиксированных клеток проводили при помощи оригинальных моноклональных антител против антигена PRAME. В работе использовали генно-инженерную конструкцию – вектор рСЕР со вставкой кодирующей последовательности гена PRAME. Для оценки уровня экспрессии генов использовали количественный вариант метода ПЦР в реальном времени. Дифференциальная экспрессия генов исследовалась при помощи микрочипов, обнаруженные различия в профилях экспрессии генов верифицировались при помощи ОТ-ПЦР в реальном времени.

Методический уровень экспериментальной части работы адекватен поставленным задачам. Статистический анализ данных был проведен с использованием корректных критериев, объем изученного материала был значительным. Достоверность и значимость результатов не вызывает сомнений. Замечаний к этому разделу работы нет.

В главе 3 «Результаты исследований» Наталья Александровна представила подробный отчет о результатах проведенных ею экспериментов. Прежде всего, задачи исследования потребовали разработать молекулярно-клеточные модели. Для этого были отобраны две исходные культуры клеток – не экспрессирующая человеческий ген PRAME линия эмбриональных фибробластов человека WI38 и линия меланомы мыши B16F10. Эти линии были трансфицированы экспрессирующим челночным вектором рСЕР, в который вставлена под контролем сильного CMV промотора кодирующая последовательность

гена PRAME. После селекции с использованием антибиотика гигромицина В были выведены производные варианты этих линий, которые устойчиво экспрессировали человеческий ген PRAME. В качестве контрольных, были получены также линии WI38 и V16F10, которые были трансфицированы вектором pCER без вставки. Все эти линии в дальнейшем были использованы в экспериментах по иммунохимическому окрашиванию моноклональными антителами против PRAME, в тестах по ингибированию клеточного роста моноклональными антителами против PRAME и по определению дифференциальной экспрессии генов методами микрочипов и ПЦР в реальном времени.

Моноклональные антитела 5D3F2 и 6H8F12 к PRAME были использованы для иммунохимического окрашивания живых и фиксированных клеток различных клеточных культур, среди которых были как не экспрессирующие ген PRAME линии опухолевых и нормальных клеток, так и линии опухолевых и нормальных клеток, экспрессирующие этот ген с разной интенсивностью (согласно данным количественной обратнo-транскриптазной реакции, сопряжённой с ПЦР в реальном времени). Эта часть диссертационной работы была наиболее трудоёмкой и продолжительной. Окрашивались и далее анализировались при помощи флуоресцентного микроскопа не только клетки опухолевых линий, но и клетки, полученные из образцов крови и костного мозга больных острыми лейкозами (в дебюте заболевания и в процессе лечения). Контроль уровня экспрессии PRAME и других генов проводили при помощи количественной ОТ-ПЦР в реальном времени. Было обнаружено, что антиген PRAME (онкобелок из семейства раково-тестикулярных генов) локализуется внутриклеточно, преимущественно в ядре, как правило, в делящихся ядрах. Отчётливое окрашивание наблюдалось также и в цитоплазме. Этот результат подтвердил находки других учёных, которые были описаны в зарубежных научных журналах. Неожиданным было то, что оригинальные антитела против PRAME окрашивали клетки ещё и по

поверхности. Ранее этот феномен никем не был замечен. Из двух вариантов антител лучше всего окрашивали PRAME-положительные опухолевые клетки и PRAME-трансфицированную модельную культуру фибробластов WI38 антитела 6H8F12. Так как антитела 5D3F2 и 6H8F12 к PRAME давали окрашивание поверхности клеток с разной интенсивностью, автор справедливо заключил, что эпитоп PRAME, тропный к антителу 6H8F12, более доступен снаружи клеток, чем эпитоп к 5D3F2. Внутри клеток существенных различий по характеру окрашивания антигена PRAME между антителами 5D3F2 и 6H8F12 не было.

В связи с тем, что Наталья Александровна обнаружила антиген PRAME на поверхности опухолевых клеток, ею была далее проведена серия блестящих экспериментов, целью которых была проверка выдвинутой ею гипотезы о том, что антитела против PRAME могут ингибировать рост PRAME экспрессирующих опухолей. Эксперименты *in vitro* подтвердили справедливость этой гипотезы. Оказалось, что антитела 5D3F2 и 6H8F12 к PRAME действительно подавляют рост культур опухолевых клеток THP-1, NOMO-1, K562 и PRAME-экспрессирующего варианта линии WI38. Ингибирующая способность антител коррелировала с уровнем экспрессии гена PRAME в клетках-мишенях. Эти опыты не только подтвердили наличие антигена PRAME на поверхности опухолевых клеток, но и заложили основу для будущих исследований по разработке терапевтических антител для лечения больных, страдающих PRAME-положительными опухолевыми заболеваниями.

То, что антитела против PRAME ингибируют рост экспрессирующих этот антиген опухолей, закономерно привело к выдвижению новой гипотезы, предусматривающей особую важность этого онкобелка для поддержания опухолевых свойств клеток, в которых этот ген активен. Для проверки этой гипотезы автор исследовал молекулярно-клеточную модель на основе эмбриональных фибробластов WI38. Анализ дифференциальной

экспрессии тотальных профилей мРНК в клетках WI38 экспрессирующих и не экспрессирующих ген PRAME, а также изучение профилей экспрессии при помощи микрочипов, несущих наборы зондов для оценки генов, ответственных за апоптоз, регуляцию клеточного цикла и кодирующих факторы транскрипции, показал, что PRAME обладает явными свойствами онкогена.

Экспериментальная часть диссертационной работы завершается опытами по оценке влияния рекомбинантного белка PRAME на дендритные клетки. Наталья Александровна выяснила, что рекомбинантных белок PRAME не токсичен для дендритных клеток и не подавляет их способности к созреванию. Более того, рекомбинантный PRAME проводил к усилению способности дендритных клеток проявлять собственную цитотоксичность в отношении клеток опухолей. Этот результат открывает новую возможность развития иммунотерапии опухолей дендритноклеточными вакцинами.

Глава 4 «Обсуждение результатов» содержит убедительный анализ новых научных фактов, обнаруженных автором. Собственные результаты автор рассматривает в контексте современного уровня знаний о молекулярно-генетических механизмах канцерогенеза. Автор на примере онкобелка PRAME рассуждает о роли раково-тестикулярных генов в процессе канцерогенеза и о том, что эти гены – перспективная мишень приложения методов иммунотерапии злокачественных опухолевых заболеваний. Этот раздел сосредоточил в себе теоретическое осмысление проделанной автором работы.

Раздел «Заключение» кратко описывает основные положения работы. Этот раздел позволяет читателю закрепить понимание ценности этой диссертационной работы для науки и практического здравоохранения.

Выводы полностью отражают содержание работы, хорошо обоснованы экспериментальными и расчётными данными и соответствуют поставленным задачам.

**Подтверждение опубликования основных результатов
диссертации в научной печати**

Результаты исследования в течение ряда лет последовательно докладывались на отечественных и международных научных конгрессах, съездах и конференциях в виде устных докладов и постеров, отражены в сборниках тезисов, которые доступны в режиме online. Результаты опубликованы в 4 статьях ВАК.

**Соответствие содержания автореферата основным положениям
диссертации**

Автореферат содержит основные положения диссертации и полностью отражает фактическую сторону исследования. Замечаний к сути работы, экспериментальным данным и вычислениям, стилю изложения и к оформлению материала нет.

Заключение

Диссертация Лыжко Натальи Александровны на тему «Клеточная локализация и функциональные свойства онкобелка PRAME» является научно-квалификационной работой, в которой содержится новое решение актуальной задачи по картированию белка PRAME в структурах опухолевых клеток и получены принципиально новые данные о влиянии экспрессии гена PRAME на активность других генов, имеющих существенное значение на процесс малигнизации, что имеет существенное значение «для онкологии». По своей актуальности, новизне, научно-практической значимости диссертация Лыжко Натальи Александровны на тему «Клеточная локализация и функциональные свойства онкобелка PRAME» соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук согласно пп. 9-14 «Положение о присуждении ученых степеней», утверждённого

Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 года №842 года (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), предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени кандидата наук, а её автор Лыжко Н.А. заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальности 14.01.12 – «Онкология».

11 марта 2019 года

Официальный оппонент:

Руководитель отделения клинической
гематологии и иммунотерапии
ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф.Владимирского

д.м.н., профессор



Голенков А.К.

Подпись д.м.н., профессора Голенкова А.К. заверяю -
Ученый секретарь института

К.М.Н.



Куликов Д.А.

государственное бюджетное учреждение здравоохранения Московской области «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского».
129110, г.Москва, ул.Щепкина, 61/2.

Тел.: 8-495-631-05-73, e-mail: a.golenkov@monikiweb.ru

www.monikiweb.ru