

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора биологических наук, ведущего научного сотрудника Московского научно-исследовательского онкологического института имени П.А. Герцена - филиала Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации КАРМАКОВОЙ Татьяны Анатольевны на диссертационную работу КОВАЛЕВОЙ Ольги Владимировны на тему «Взаимодействие микробиома и иммунокомпетентных клеток стромы в прогрессии опухолей», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 3.1.6. – Онкология, лучевая терапия

Актуальность темы исследования

Злокачественные новообразования являются второй по значимости причиной смерти в человеческом обществе. Растущая заболеваемость злокачественными опухолями, обусловленная, не в последнюю очередь, неуклонным старением населения, отсутствие надежных методов скрининга и профилактики для большинства локализаций опухолевого поражения, поздняя диагностика рака у значительной части больных, ограниченные возможности радикального лечения на поздних стадиях заболевания – все это выводит злокачественные новообразования в число наиболее актуальных проблем современной медицины.

Решение этой проблемы невозможно без глубокого понимания механизмов развития опухолевого процесса. Исследования в области молекулярной биологии и молекулярной генетики за последние десятилетия значительно расширили представления научного сообщества о сложных биологических процессах канцерогенеза. Общеизвестно, что в основе неопластической трансформации лежат генетические нарушения и эпигенетические изменения, накопление которых обуславливает формирование агрессивных биологических свойств клеток, обеспечивает их выживание, размножение и распространение. Важнейшим условием развития опухоли является ее способность индуцировать неоангиогенез, приспосабливаться к метаболическому стрессу. За последние десятилетия получены неоспоримые доказательства важнейшей роли иммунных механизмов в возникновении и прогрессии злокачественного роста. Сегодня мы являемся свидетелями настоящей революции в понимании взаимодействий между опухолью и иммунной системой, что стало основой для создания принципиально новых подходов к лечению новообразований, таких как ингибиторы контрольных точек иммунитета, дендритноклеточные вакцины и иммунотерапия генно-модифицированными лимфоцитами. Активно изучается роль

хронического воспаления в развитии опухолей, последствия которого способны повлиять практически на все аспекты онкогенеза.

И, наконец, в последние годы огромный интерес привлечен к биологической триаде – рак, иммунная система и микробиота. В ходе эволюции сформировались тесные реципрокные связи между жизнедеятельностью микроорганизмов-комменсалов и иммунной системой организма-хозяина. Считается, что дисбаланс микрофлоры может провоцировать возникновение неопластических нарушений, а условно патогенные микроорганизмы и дисбиоз могут служить фактором прогрессии некоторых злокачественных новообразований, как прямым образом – за счет выделения биологически активных продуктов и метаболитов, стимулирующие пролиферацию и мутагенез в опухолевых клетках, так и косвенно – влияя на активность иммунных клеток и развитие опухоль-промотирующего хронического воспаления. Существуют данные, свидетельствующие о том, что состав микробиоты может определять ответ опухоли на лекарственное лечение, коррелировать с выживаемостью больных, а модуляция микробиома может быть использована для усиления эффективности иммунотерапии и снижения ее токсичности.

Диссертационная работа Ковалевой Ольги Владимировны посвящена изучению фундаментальных механизмов взаимодействия между микробиотой, ассоциированной со злокачественными опухолями, и иммунными клетками, инфильтрирующими опухоль, в аспекте вклада этих взаимодействий в опухолевую прогрессию. В свете сказанного выше, такое исследование, несомненно, является актуальным и вызывает значительный интерес.

Новизна полученных результатов диссертационного исследования

Автором выполнено оригинальное исследование, в котором проведено комплексное изучение клеточного состава стромы НМРЛ и рака пищевода в сопоставлении с качественными и количественными характеристиками микробиоты, ассоциированной с этими новообразованиями. Описаны новые, до настоящего времени крайне недостаточно изученные маркеры клеток макрофагального ряда. В работе использована оригинальная, разработанная автором модель оценки влияния стимулированных цитотоксических макрофагов на опухолевые клетки. Широкий спектр исследованных факторов, всесторонний анализ данных и глубина проработки материала позволили автору получить целый ряд принципиально новых результатов. Так, в ходе исследования выявлена прогностическая значимость определенных комплексных показателей. Описаны сигнальные пути, ответственные за активацию стромальных макрофагов в условиях бактериальной инвазии. Выявлено, что прогностическая значимость бактериальной нагрузки в ткани опухоли зависит

от характера клеточной инфильтрации, что дает информацию к размышлению о сложных взаимоотношениях в рамках упомянутой выше биологической триады.

Новизна полученных результатов, в сопоставлении с данными опубликованных исследований, сомнений не вызывает.

Обоснованность и достоверность полученных результатов, обоснованность выводов и практических рекомендаций

Диссертационная работа выполнена согласно общепринятым современным принципам клиничко-лабораторного исследования. Достоверность полученных результатов подкреплена исчерпывающим описанием использованных реагентов, методов и технических процедур, репрезентативным количеством наблюдений и грамотной характеристикой клинического материала, ясным и последовательным изложением этапов исследования и использованных в нем подходов.

Автором исследованы 100 образцов тканей немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ, плоскоклеточного рака и аденокарциномы) и 48 образцов плоскоклеточного рака пищевода. С использованием широкой панели маркеров изучен фенотип клеток, входящих в состав стромы опухолей (макрофаги, лимфоциты, клетки эндотелия) и экспрессия ряда из этих маркеров в опухолевых клетках. С применением современных методов генетического анализа (метагеномное секвенирование) изучен таксономический состав микробиоты, ассоциированной с опухолевой тканью. Выполнен анализ полученных данных в зависимости от клиничко-морфологических особенностей заболевания и их корреляция с выживаемостью больных. Обработка результатов проведена с использованием адекватных методов статистического анализа.

Выводы соответствуют поставленным задачам, непосредственно следуют из результатов выполненного автором исследования.

Значимость для науки и практики полученных автором результатов

Полученные автором данные свидетельствуют о сложных патофизиологических механизмах, происходящих в организме онкологического больного на уровне взаимоотношений агрессивно растущей опухоли, иммунной системой и резидентной микрофлорой. Результаты диссертационной работы, описывающие взаимосвязь между микробиомом опухолей легкого и пищевода, с одной стороны, и иммунным и воспалительным микроокружением этих новообразований, с другой стороны, имеют глубокое фундаментальное значение для понимания механизмов иммуносупрессии, индуцируемой в опухолевой ткани, и ее роли в прогрессии новообразований. Эти результаты являются основой для дальнейших расширенных и углубленных исследований в заданном

направлении. Возможно, что полученные данные станут предпосылкой для разработки новых прогностических алгоритмов, дополняющих существующие системы клинко-морфологических критериев, что особенно важно и интересно в аспекте бурного развития современных методов иммунотерапии.

Структура и содержание диссертационной работы

Диссертация построена по традиционному плану, содержит введение, главу «Материалы и методы», описание результатов и их обсуждение, заключение, выводы и список литературы. В целом рукопись представляет собой 220 страниц машинописного текста, содержит 23 таблицы, которые структурируют фактический материал, и 89 рисунков, представляющих первичные данные, результаты их анализа, а также поясняющие отдельные разделы текста.

Во **Введении** автор традиционно обосновывает актуальность проблемы, формулирует цель и задачи исследования, его научную новизну и научно-практическую значимость, основные положения, выносимые на защиту, сведения, касающиеся апробации работы и публикаций по теме диссертации. Здесь хочется особо отметить раздел, представляющий перечень методов исследования. Принимая во внимание большое количество разнообразных методологических подходов, привлеченных для решения поставленных задач, такое сжатое и понятное их изложение существенно облегчает понимание общего дизайна работы.

Фундаментальные предпосылки работы изложены полно и ясно, обоснованно подводят к формулировке цели и задач исследования.

В обзоре литературы подробно представлены современные сведения, относящиеся к теме исследования, что полностью раскрывает его проблематику. Дана характеристика основным объектам исследования и рассматриваемым в работе процессам и явлениям. Обзор написан хорошим литературным языком, прекрасно иллюстрирован, демонстрирует прекрасное знание автором источников, его критический взгляд и стремление к глубокому и всестороннему анализу проблемы.

Глава «Материалы и методы» дает возможность получить исчерпывающую информацию об использованных методах, приборах и реагентах, то есть содержит сведения, позволяющие оценить корректность и качество исполнения процедур на всех этапах исследования. Впечатляет широчайший набор использованных лабораторных методик, которые включают и рутинные гистологические и иммуногистохимические техники, и самые современные методы биохимии, иммунохимии, молекулярной биологии и молекулярной генетики, и работу с клеточной культурой, и иммунизацию животных для получения

оригинальных моноклональных антител. Все это свидетельствует о высоком уровне исследования и широкой профессиональной компетенции соискателя.

Глава «Результаты» включает 8 разделов, из которых 3 раздела посвящены исследованиям на материала опухолей легкого, 3 раздела – на материала опухолей пищевода. Здесь автор характеризует иммунокомпетентные клетки, инфильтрирующие строму опухолей, таксономический состав микробиоты в образцах опухолей и проводит комплексный анализ полученных данных. Два раздела посвящены изучению фундаментальных механизмов взаимодействия злокачественных клеток и опухоль-ассоциированных макрофагов, в том числе, в аспекте влияния на эти процессы локальной микробиоты.

Макрофаги не случайно являются главным объектом интереса автора. С одной стороны, именно этим клеткам приписывают существенную роль в развитии опухолевого процесса – от создания условий для появления трансформированных клеток до прогрессии злокачественной опухоли. С другой стороны, макрофаги являются первой линией обороны перед лицом микробной инвазии, инициируют воспалительные реакции и специфический иммунный ответ, опосредуют кооперативное взаимодействие различных ветвей клеточного гомеостаза. Вызывает уважение огромный объем выполненных исследований и большая и скрупулезная аналитическая работа. Для множества исследованных параметров (макрофагов различного фенотипа, уровня экспрессии отдельных маркеров в макрофагах стромы и опухолевых клетках, присутствия Т- и В-лимфоцитов, а также клеток эндотелия в опухолевой ткани, степени бактериальной нагрузки), автором изучены корреляции с клинико-морфологическими характеристиками опухолей и выживаемостью больных. Выполнено сопоставление характеристик микробиома с результатами определения фенотипа иммунокомпетентных клеток. Материал сопровождается таблицами и диаграммами, которые последовательно, четко и объективно представляют полученные данные, а также результаты их методичной статистической обработки.

Комплексный анализ данных этого исследования, позволили автору выявить определенные взаимосвязи между характером воспалительного инфильтрата и особенностями микробиоты в опухолевой ткани, и, самое интересное – сочетания факторов, коррелирующие с выживаемостью больных, то есть, потенциально значимые для оценки прогноза заболевания. Важно, что эти результаты согласуются с контекстом предположений, ставших основанием для выполнения данной работы.

Два последних раздела этой главы содержат результаты экспериментальных исследований. Здесь, во-первых, автору удалось достаточно убедительно показать, что макрофаги способны непосредственно принимать участие в процессе так называемого

«редактирования» опухоли – то есть, в отборе наиболее агрессивных клонов. Во-вторых, получены результаты, которые свидетельствуют о возможной роли резидентной микробиоты в формировании определенного функционального спектра воспалительного инфильтрата. Экспериментальные исследования выполнены на высоком методическом уровне, корректно, изящно. Нельзя особо не отметить крайне сложную, многоплановую и интересную работу по получению и характеристике опухолевых клеток, устойчивых к цитотоксическому действию макрофагов, для модельных исследований. Эта работа включает не только исследования *in vitro*, но и идентификацию на уровне сигнальных путей молекулярных изменений, ассоциированных с данным фенотипом, а также подтверждение свойств модели *in vivo*.

Еще раз подчеркну, что работа прекрасно иллюстрирована информативными диаграммами, поясняющими схемами и высококачественными микрофотографиями.

В обсуждении соискатель обобщает и интерпретирует полученные результаты, дает критическую оценку проблемным моментам, сопоставляет свои данные с данными литературы. Заключение резюмирует результаты работы и завершает изложение выводами, соответствующими поставленным задачам.

Список литературы включает 389 источников, из которых два, относящиеся к методической части, – отечественные, остальные – зарубежные издания. Материалы диссертации представлены в 36 публикациях в зарубежных и отечественных журналах (из них статей в журналах списка ВАК – 15). Результаты работы докладывались на отечественных и международных научных форумах.

Автореферат полностью отражает суть и основные положения диссертационной работы.

Оценка научной работы соискателя в целом, замечания и вопросы.

Рецензируемая диссертация представляет собой полновесное, многоплановое и целостное исследование, которое обладает внутренним единством, содержит научные результаты ценные для фундаментальной науки и несет в себе предпосылки для разработки подходов, перспективных для практического применения.

Принципиальных замечаний по содержанию и оформлению работы нет. При знакомстве с текстом диссертации, большей частью, во введении и в обзоре литературы, отмечены недостаточно точные, на мой взгляд, формулировки, единичные опечатки и фразеологические погрешности. Отдельные спорные суждения и излишне категоричные, на мой взгляд, утверждения (например, в формулировке Положения, выносимого на защиту №2, в формулировке научно-практической значимости) были обсуждены с соискателем.

Замечания, которые носят рекомендательный характер:

1) Некоторые тезисы в разделах «Научная новизна» (предложения 8 и 9) и «Теоретическая и практическая значимость» (предложения 1 и 2) по своим формулировкам, на мой взгляд, не соответствуют контексту этих разделов.

2) Стилистическая формулировка положения, выносимого на защиту №3, неудачна тем, что относит к оригинальным и приоритетным достижениям работы характеристику отличий как в количественной нагрузке, так и в качественном составе микробиома опухолей, что не совсем корректно.

3) В отдельных случаях представляется спорным использование статистического критерия Вилкоксона для парных выборок при сравнении групп наблюдений.

4) Формулировка выводов по сути своей корректна, но по стилю в большей степени соответствует изложению новизны полученных результатов.

Все эти замечания ни в коей мере не умаляют благоприятного впечатления от прочтения рукописи.

В рамках дискуссии хотелось бы услышать мнение соискателя по следующим вопросам:

1) Какими преимуществами обладает маркер PU.1, охарактеризованный в работе, по сравнению с другими известными общими маркерами макрофагов?

2) В обсуждении соискатель обращает внимание на неоднозначность оценки клинической значимости тех или иных клеток микроокружения опухолей в опубликованных работах. В чем, по мнению автора, может быть причина подобных расхождений?

3) Одним из наиболее интересных и важных результатов работы, на мой взгляд, является тезис о том, что цитотоксическая активность макрофагов может способствовать отбору более злокачественных клонов опухолевых клеток. Иммуноредактирование опухоли, по сегодняшним представлениям, один из ключевых механизмов ускользания клеток злокачественных новообразований от иммунного надзора. В то же время, известно, что сегодня разрабатываются различные стратегии, направленные на повышение количества цитотоксических макрофагов в опухолевой ткани (Duan, Z., Luo, Y. Targeting macrophages in cancer immunotherapy. *Sig Transduct Target Ther.* 2021; **6**, 127). Не будет ли такой подход иметь и обратный эффект, то есть способствовать опухолевой прогрессии, в свете неоднозначной роли M1 макрофагов?

Заключение

Диссертационная работа Ковалевой Ольги Владимировны «Взаимодействие микробиома и иммунокомпетентных клеток стромы в прогрессии опухолей» является законченной, самостоятельной научно-квалификационной работой, содержащей новое

решение актуальной фундаментальной научной проблемы – раскрытие механизмов взаимодействия между микробиотой и иммунными клетками, ассоциированными со злокачественными опухолями, в аспекте вклада этих взаимодействий в опухолевую прогрессию. Научные результаты диссертации могут быть квалифицированы как значимые для фундаментальной онкологии и обладают несомненным потенциалом для разработки новых прогностических методик и алгоритмов, востребованных онкологической клиникой. Работа заслуживает положительной оценки по актуальности решаемых задач, новизне полученных результатов и высочайшему уровню методического исполнения.

По новизне, научной и практической ценности полученных результатов диссертация соответствует требованиям пп. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24 сентября 2013 г. (в редакции постановлений Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 г. № 335, от 20 марта 2021 года №426, от 11 сентября 2021 г. №1539), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 3.1.6. Онкология, лучевая терапия.

Даю согласие на сбор, обработку, хранение и передачу персональных данных в диссертационный совет 21.1.032.01 (Д 001.017.01) созданного на базе на базе ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России

Ведущий научный сотрудник отделения прогноза
эффективности консервативного лечения
МНИОИ имени П.А.Герцена - филиала ФГБУ
«НМИЦ радиологии» Минздрава России,
доктор биологических наук (14.01.12 – Онкология)
« 18 » 08 2022 г.

Кармакова Татьяна Анатольевна

Подпись руки д.б.н. Кармаковой Т.А. **заверяю**
Ученый секретарь
МНИОИ имени П.А. Герцена - филиала ФГБУ
«НМИЦ радиологии» Минздрава России



Жарова Елена Петровна

Московский научно-исследовательский онкологический институт имени П.А. Герцена (МНИОИ имени П.А.Герцена) - филиал федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России). Адрес: 125284, г. Москва, 2-й Боткинский пр., д. 3. Тел. +8 (495) 945-74-15; +7 (906) 771-89-81. E-mail: kalmar123@yandex.ru