

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора медицинских наук Балдуевой Ирины Александровны на диссертацию Лыжко Натальи Александровны на тему «Клеточная локализация и функциональные свойства онкобелка PRAME», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.01.12 – онкология

Актуальность темы диссертации

В настоящее время иммунотерапия злокачественных опухолей – одна из наиболее бурно развивающихся областей онкологии, и представления о важной роли иммунной системы в процессах опухолевого роста заняли прочные позиции в системе существующих знаний. В этом контексте изучение особенностей поведения опухоли и ее взаимодействия с компонентами иммунной системы дает возможность определения новых мишеней для разработки иммунотерапевтических стратегий.

Последние десятилетия большое внимание уделяют изучению раково-тестикулярных антигенов (РТА), представляющих собой кластер опухолеассоциированных белков, которые практически не экспрессируются в нормальных соматических клетках, за исключением клеток семенников и плаценты, но широко представлены в разнообразных злокачественных новообразованиях. Благодаря интенсивным исследованиям функций РТА, уже стало известно, что активность этих генов ассоциирована со многими клеточными процессами, такими как сигнальная трансдукция, транскрипционная регуляция, активация протоонкогенов, пролиферация.

РТА принимают участие в формировании неопластического фенотипа клеток, связаны с иммортализацией, биологической агрессивностью, появлением способности к инвазии и метастазированию. Однако, несмотря на активные исследования РТА, знания об их роли в жизнедеятельности опухолевых клеток остаются далеко не полными и, подчас, противоречивыми. PRAME\MAPE\OIP4 является нетипичным РТА,

экспрессия которого была обнаружена впервые в меланомах, а затем в большинстве солидных опухолей и при лимфопролиферативных заболеваниях. В связи с открывшейся возможностью использования белка PRAME для терапии злокачественных новообразований, важным становится вопрос об его локализации в опухолевой клетке. Накопленные результаты, полученные в лабораториях по всему миру, свидетельствуют о многообразии клеточных функций белка PRAME, однако существует много аспектов, которые предстоит еще изучить.

Таким образом, данная диссертационная работа, целью которой явилось изучение клеточной локализации и функциональных свойств онкобелка PRAME с использованием культур нормальных и опухолевых клеток *in vitro*, представляет собой крайне своевременное и актуальное исследование.

Новизна исследования и полученных результатов диссертации

В результате проведенного исследования эпитопы белка PRAME обнаружены не только внутриклеточно, но и на поверхности опухолевой клетки. Автором выявлено цитостатическое действие моноклональных антител (МКА) к белку PRAME на малигнизированные клетки. Показано на модели линии WI-38, которая экспрессирует белок PRAME, влияние экспрессии гена *PRAME* на уровень экспрессии ряда генов, таких как *MAGE-A3*, *MAGE-A6*, *MAGE-A12*, *TNFAIP8*, *BNIP1*, *RIPK1*, *GIP3*, *SP110*, *MAD2L1*, *EMP2*, *IRF9*, *STAT1*, *RAB2*, *BOP1*, *ACTINB*, *PLAB*, *PCTK1*, *TNFAIP2*, *TNRC6*. При нагрузке дендритных клеток (ДК) белком PRAME обнаружено усиление их цитотоксического действия в отношении опухолевых клеток.

Значимость для науки и практики полученных результатов

Доказательством практической значимости диссертационного исследования Лыжко Н.А. является факт обнаружения эпитопов белка PRAME на поверхности опухолевой клетки, что позволяет использовать этот антиген в качестве мишени для иммунотерапии опухолей. Полученный

эффект цитостатического действия антител к белку PRAME на PRAME-экспрессирующие опухолевые клетки позволяет использовать МКА к белку PRAME в качестве основы для разработки противоопухолевого лекарственного средства. Рекомбинантный антиген PRAME может быть использован для нагрузки ДК при разработке противоопухолевых ДК-вакцин, а моноклональные антитела против PRAME – для диагностики злокачественных новообразований, а также для изучения механизмов канцерогенеза.

Теоретическая значимость полученных автором результатов связана с расширением знаний о локализации и функциональной роли РТА, что позволяет использовать эти знания для создания новых иммунотерапевтических подходов в лечении онкологических заболеваний.

Обоснованность и достоверность основных положений, результатов и выводов диссертации

Работа построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, главы «Материалы и методы», где описаны применяемые автором методики; главы по результатам собственных исследований, обсуждения полученных результатов, заключения, выводов, списка сокращений и списка использованной литературы.

Библиографический указатель включает 11 отечественных и 233 зарубежных источника, большая часть из которых опубликована в течение последних 7 лет. Объем диссертации - 129 стр., текст проиллюстрирован 17 рисунками и 4 таблицами.

Во введении автор определяет актуальность исследования, формулирует цель и задачи, научную новизну, теоретическую и практическую значимость, методологию и методы исследования, определяет степень достоверности диссертационной работы, представляет положения, выносимые на защиту.

Также указывается личный вклад автора, где отмечается, что автор принимал участие непосредственно во всех этапах работы, начиная от сбора информации и заканчивая постановкой экспериментов и анализом полученных данных.

В главе 1 «Обзор литературы» автор подробно излагает историю исследования РТА, останавливаясь более детально на использовании открытий в этой области для терапии лейкозов. Затем освещены вопросы, связанные с исследованиями гена *PRAME*, его значения для терапии злокачественных новообразований. Описывая все известные на сегодняшний день данные о функциях *PRAME* в клетке, автор рассматривает возможности, связанные с идентификацией экспрессии этого гена как маркера для дифференциальной диагностики опухолей человека, в частности при меланоме кожи. Описано представление о тех направлениях иммунотерапии опухолей, которые развиваются с применением знаний о гене *PRAME*: пептидные вакцины для лечения рака предстательной железы, вакцины на основе рекомбинантного белка *PRAME* в сочетании с различными адъювантами для лечения меланомы кожи и немелкоклеточного рака легкого. В контексте разработки вакцин на основе дендритных клеток кратко изложены имеющиеся на сегодняшний день данные о биологии ДК, в том числе при опухолевом росте, способности ДК к прямым цитотоксическим реакциям и значении этого феномена в обеспечении противоопухолевого иммунитета. Литературные данные описаны хорошим языком и позволяют определить место и значение предпринятого исследования в системе существующих научных положений, однако, необходимо отметить, что обзор литературы содержит ряд неточностей, которые несколько снижают качество рукописи. Так, автор описывает применение идентификации экспрессии гена *PRAME* в дифференциальной диагностике солидных опухолей (стр.25), где в качестве примера приводит сравнительные данные по изучению гена и белка *PRAME* при миллиарной

карциноме и злокачественной мезотелиоме, то есть сравнивает тип роста с гистологической формой опухоли.

В главе 2 «Материалы и методы» представлено описание материала исследования и подробно охарактеризованы методы, которые автор использовал в своей диссертационной работе. Работа была выполнена на клеточных линиях, таких как эритромиелоидный лейкоз человека K562, нормальные фибробласты человека WI-38, меланомы человека melKor, мышечная меланома B16F10, лимфома человека U937, лейкозные моноцитарные THP-1, промоноцитарные NOMO-1 линии клеток человека. Также автор использовал клетки костного мозга и крови 40 больных лейкозами, забор материала производили после постановки диагноза и в процессе лечения заболевания. Использовался широкий спектр методов культивирования клеток, в том числе дендритных клеток, методы трансфекции линий культивируемых клеток плазмидой, содержащей ген PRAME, методы выделения лимфоцитов из периферической крови больных, приготовления препаратов из клеток костного мозга для иммуногистохимического окрашивания, МТТ-тест, метод анализа микрочипов, выделения РНК и ДНК в реальном времени.

Избранные методы в полной мере соответствуют поставленным задачам настоящего исследования. В тоже время автор не представил сведения о тех статистических методах, которые он использовал для обработки результатов.

Третья глава «Результаты исследований» посвящена результатам собственных исследований. В первой части исследования Н.А. Лыжко представляет результаты по получению линий клеток WI-38 В и 16F10, трансфицированных плазмидным вектором, который содержит кодирующую часть гена PRAME. Затем автор рассматривает данные, полученные при изучении локализации белка PRAME в клетке, которые позволяют сделать вывод, что в клетках опухолевых линий K562, melKor, B16F10PRAME, WI-

38PRAME, а также в малигнизированных клетках, локализованных в костном мозге больных острыми лейкозами, этот белок расположен внутриклеточно (в ядре и в цитоплазме) и на поверхности цитоплазматической мембраны. При анализе воздействия МКА против белка PRAME на пролиферацию его экспрессирующих опухолевых клеток удалось установить, что МКА 5D3F2 и 6H8F12 оказывают цитостатическое действие на PRAME-экспрессирующие опухолевые клетки, причем в наибольшей степени были подвержены гибели клетки линий K562 и WI-38PRAME. В клетках линий ТНР-1 и NОМО-1 наблюдалось меньшее число погибших клеток, чем в K562. Количество погибших клеток в линии WI-38 было статистически значимо меньше, чем в линии K562. При изучении влияния экспрессии гена *PRAME* на транскрипционный профиль клеточной линии WI-38PRAME автором было выявлено, что активность этого гена ассоциирована с активацией группы генов *MAGE-A3*, *MAGE-A6*, *MAGE-A12*, *TNFAIP8*, *BNIP1*, *RIPK1*, *GIP3*, *SP110*, *MAD2L1*, *EMP2*, *IRF9*, *STAT1*, *RAB2*, *BOPI*, *ACTINB*, отражающих прогрессию опухоли. При исследовании цитотоксической активности ДК после нагрузки рекомбинантным белком PRAME было показано, что ДК сохраняют и в ряде случаев увеличивают цитотоксическую активность, а также проявление цитотоксического действия ДК прямо зависит от степени зрелости ДК и величины соотношения ДК: клетки опухоли.

Таким образом, автором создана клеточная модель, позволяющая изучать функциональные свойства гена *PRAME*, убедительно показано, что активация гена *PRAME* ассоциирована с процессами клеточной пролиферации и активацией генов, участвующих в прогрессии опухоли, продемонстрированы возможности нагрузки рекомбинантным белком PRAME дендритных клеток, что создает предпосылки для создания нового поколения ДК-вакцин.

Глава 4 «Обсуждение результатов» содержит обсуждение полученных результатов исследования, где имеет место подробный

сравнительный анализ совокупности данных, имеющихся в мировой и отечественной литературе, и детальное обсуждение собственных результатов, что дает основания для формирования полноценных выводов.

Раздел «Заключение» содержит краткое резюме проведенных исследований и полученных результатов. Он дает возможность читателю провести оценку теоретической и практической значимости данной работы.

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

Подтверждение опубликования основных результатов диссертации в научной печати

Результаты исследования были представлены в виде устных докладов и постеров на отечественных и зарубежных конференциях, съездах, опубликованы в сборниках тезисов, доступных в online режиме. Полученные результаты были опубликованы в 4 статьях ВАК.

Соответствие содержания автореферата основным положениям диссертации

Автореферат содержит основные положения диссертации и полностью отражает фактическую сторону исследования.

Принципиальных замечаний по сути работы, экспериментальным данным и вычислениям, стилю изложения и оформлению материала нет.

В качестве дискуссии хотелось бы задать несколько вопросов:

1. Эксперименты с использованием МКА против белка PRAME показали различие в чувствительности опухолевых клеток разных линий. Какие биологические закономерности могут лежать в основе этого явления?

2. Какое значение может иметь изученный автором феномен усиления цитотоксической активности ДК, нагруженных рекомбинантным белком PRAME, для разработки противоопухолевых ДК-вакцин?

Заключение

Диссертация Лыжко Натальи Александровны на тему «Клеточная локализация и функциональные свойства онкобелка PRAME» является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной задачи, направленной на выявление морфологической локализации и функциональных особенностей продукта экспрессии раково-тестикулярного гена *PRAME*. 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 24.09.2013 № 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), а её автор Лыжко Н.А. достойна присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.01.12 – «Онкология».

03 апреля 2019 года

Официальный оппонент:

Заведующий научным отделом онкоиммунологии
Федерального государственного бюджетного учреждения
«Национальный медицинский исследовательский центр
онкологии им. Н.Н. Петрова»

Министерства здравоохранения
Российской Федерации,

д.м.н



Балдуева И.А.

Подпись д.м.н. Балдуевой И.А. заверяю

Ученый секретарь  / Киравы И.С.



Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный
медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н.Петрова» Министерства
здравоохранения Российской Федерации. 197758, г. Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул.
Ленинградская, д.68.

Тел.:(812)439-95-55, e-mail: oncl@rion.spb.ru