

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ФГБУ

«НИИ онкологии им. Н.Н.Петрова»

Минздрава России

доктор медицинских наук, профессор,

А.М.Беляев

2015 года



ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

о научно-практической значимости диссертационной работы Куликовой Екатерины Владимировны «Индукция противоопухолевого иммунного ответа *in vitro* дендритными клетками, трансфицированными полиэпитопными ДНК-конструкциями», представляемой на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология.

Актуальность темы

В настоящее время колоректальный рак занимает третье место в мире по частоте встречаемости среди онкологических заболеваний, и предполагается, что к 2035 году при существующей системе подходов к лечению данного злокачественного новообразования можно ожидать более 2,4 миллионов пациентов с этим видом опухоли (Jayne D.G. et al., 2002; Lemmens V.E. et al., 2011; Segelman J. et al., 2012; März L., Piso P., 2015). Выбор тактики лечения больных колоректальным раком основывается на выявлении локализации и стадии опухолевого процесса, его распространенности, наличия/отсутствия сопутствующих заболеваний. Основным методом лечения по-прежнему остается хирургическое вмешательство в сочетании с химио- и радиотерапией, однако пятилетняя выживаемость составляет не более 54% (Ferlay J. et al., 2010; Huang L. et al., 2014). Поиск новых возможностей лечения пациентов с диссеминированными формами злокачественных опухолей является актуальной задачей современной онкологии. Значительный прогресс в области молекулярной биологии, генетики, иммунологии позволил в последние десятилетия разрабатывать новые более эффективные способы терапии, основанные прежде всего на понимании закономерностей функционирования иммунной системы в условиях опухолевого роста, взаимоотношений и взаимовлияния малигнизированных клеток и их микроокружения. На современном этапе развития науки не представляет сомнений факт участия дендритных клеток (ДК) в «высокопрофессиональной» презентации низкоиммуногенных

опухолеассоциированных антигенов (ОАА). ДК являются объектом широкого круга исследований, основной целью которых является создание клеточных вакцин, способных корректировать иммунный ответ у больных со злокачественными новообразованиями. По данным электронного регистра клинических исследований Национального института здоровья США (www.clinicaltrial.gov) в настоящее время в мире проводится более 200 клинических испытаний I-II-III фаз с использованием ДК в лечении различных онкологических заболеваний, в том числе рака толстой кишки. Однако, несмотря на то, что существует множество методов получения *in vitro* ДК, которые способны стимулировать противоопухолевый иммунный ответ, до настоящего времени ДНК-конструкции для активации противоопухолевого иммунного ответа при колоректальном раке не разрабатывались и не исследовались, в то время как именно трансфекция ДК с помощью плазмидных и вирусных конструкций, несущих нуклеотидные последовательности, которые кодируют полные ОАА или селективные эпитопы, позволяет получать наиболее специфичную иммуностимуляцию и стандартизировать процесс активации ДК *in vitro*.

Таким образом, исследование по эффективности индукции клеточного цитотоксического иммунного ответа в культуре моноклеарных клеток (МНК) больных колоректальным раком с помощью ДК, трансфецированных ДНК-конструкциями, содержащими эпитопы ОАА, является одним из актуальных направлений современной онкоиммунологии в создании стандартизированных подходов к решению проблемы активации противоопухолевого иммунного ответа при данной патологии и требует всестороннего изучения.

Научная новизна

Выполненная работа является комплексным, многофакторным исследованием, раскрывшая, на основе использования современных высокотехнологичных методик, новый, научно обоснованный путь решения актуальной проблемы клинической иммунологии – получение эффективного индуцированного противоопухолевого иммунного ответа у больных колоректальным раком на основе трансфекции ДК ДНК-конструкциями, кодирующими эпитопы ОАА, характерных для этой опухоли, с целью создания новой стратегии активной специфической иммунотерапии, позволяющей улучшить результаты лечения этой категории онкологических больных. Автором разработана оригинальная ДНК-конструкция pCI-UB-POLYEP1, кодирующая эпитопы ОАА колоректального рака, показано, что зрелые ДК, трансфецированные этой ДНК-конструкцией, индуцируют способность МНК лизировать опухолевые клетки-мишени после совместного культивирования. Установлено, что использование искомой ДНК-конструкции также эффективно для индукции

цитотоксического иммунного ответа *in vitro* у больных колоректальным раком, как и активация ДК с помощью нагрузки опухолевым лизатом.

Научно-практическая значимость

Проведённое исследование позволило научно обосновать возможность, необходимость и эффективность использования ДНК-конструкций, кодирующих иммуногенные эпитопы ОАА СЕА, ЕрСАМ и MUC4 для трансфекции ДК с целью их активации и стимуляции цитотоксического потенциала МНК. Полученные данные указывают, что уровень стимуляции МНК зрелыми ДК, активированными путем введения изученных ДНК-конструкций, зависит от вида сигнальной последовательности (убиквитина или легкой каппа-цепи иммуноглобулинов) в составе плазмидной конструкции, что может говорить о различных механизмах влияния данных сигнальных последовательностей на процессинг и презентацию эпитопов.

Практическая значимость работы заключается в экспериментальном обосновании способа модуляции клеточного иммунного ответа в культуре МНК больных колоректальным раком, который может быть положен в основу новой альтернативной клеточной технологии лечения этого онкологического заболевания. Автором получен патент на изобретение № 2507265 «Рекомбинантная плазмидная ДНК pCI-UB-POLYEPI, содержащая эпитопы опухоль-ассоциированных антигенов для колоректального рака, и способ ее применения для стимуляции специфического противоопухолевого иммунного ответа против клеток колоректального рака».

Достоверность и обоснованность

Цель и задачи исследования, положения, выносимые на защиту, сформулированы ясно и убедительно. Материалом для исследования послужили образцы периферической крови и фрагменты тканей опухолей 49 больных колоректальным раком, проходивших лечение в городском центре колопроктологии ГБУЗ НСО ГКБ №11 и ГБУЗ НСО ГКБ №1, г.Новосибирск. Значительный объем данных, полученный при непосредственном участии автора, состоящий из результатов обследования больных, приготовления образцов МНК, опухолевых клеток, зрелых ДК, магнитной трансфекции ДК, анализа фенотипа и функциональной активности ДК, экспериментального моделирования иммунологических реакций, позволил адекватно использовать соответствующие задачам статистические методы, что убеждает в достоверности полученных результатов.

Оценка содержания работы

Диссертация написана согласно современным требованиям и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, главы по результатам собственных исследований, обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Данные исследования изложены на 105 страницах текста. Работа содержит 3 таблицы и 14 рисунков. Список литературы включает 196 источников, в том числе 12 отечественных и 184 иностранных авторов.

Во введении автор детально определяет актуальность исследования, формулирует цель и задачи, научную новизну и практическую значимость, а также положения, выносимые на защиту.

В литературном обзоре (глава 1) проводится всесторонний анализ современного состояния проблем, связанных с пониманием механизмов противоопухолевого иммунитета и нарушения специфических иммунологических реакций у онкологических больных, роли ДК в противоопухолевом иммунитете при колоректальном раке. Убедительно сопоставлены преимущества и недостатки способов доставки различных видов антигенов в ДК для индукции специфического противоопухолевого иммунного ответа, проанализированы имеющиеся в мировой литературе материалы по ОАА колоректального рака.

Литературные данные обобщены и описаны хорошим языком и позволяют определить место и значение предпринятого исследования в системе существующих научных положений.

Во второй главе описан клинический и экспериментальный материал, используемые методы, проведена характеристика контингента больных, определён и описан дизайн исследования и раскрыты статистические методы проведения анализа. Показано, что материалом для работы служили образцы периферической крови и фрагменты тканей опухолей 49 больных, которым на основании гистологического исследования был поставлен диагноз аденокарцинома толстого кишечника. Из периферической крови были выделены МНК, из которых получали ДК, используемые в дальнейших экспериментах. Опухолевые образцы были подвергнуты ферментативной дезагрегации и использованы для приготовления опухолевого лизата и для теста по определению цитотоксического эффекта. Автором была отработана и использована методика магнитной трансфекции ДК созданными ДНК-конструкциями и определения ее эффективности, а также проведено изучение фенотипа ДК и оценка функциональной активности ДК с помощью проточной цитофлуориметрии.

Объём изученного материала и избранные методы статистического анализа не вызывают сомнений в значимости и достоверности полученных результатов.

Третья глава посвящена результатам собственных исследований. Автор представляет характеристику фенотипических и функциональных показателей ДК, полученных из адгезирующей фракции МНК периферической крови больных колоректальным раком. Полученные данные свидетельствуют о возможности генерации ДК из клеток-предшественников периферической крови пациентов при данной патологии в условиях культивирования *in vitro*. В работе подробно охарактеризованы плазмидные конструкции, несущие последовательности эпитопов ОАА. Показано, что плазмидная конструкция pCI-UB-POLYEP1 привлекает в своем механизме процессинга и презентации в первую очередь убиквитин-протеасомную систему деградации белков, а конструкция pCI-Sec-POLYEP1 эффективную доставку в эндоплазматический ретикулум. Проведена оценка эффективности доставки ДНК-конструкций, кодирующих эпитопы ОАА, в ДК методом магнитной трансфекции. С помощью протокола магнитной трансфекции автору удалось получить высокую эффективность доставки ДНК-конструкций в зрелые ДК (в пределах 70%), и для оценки способности полученных ДК, трансфецированных экспериментальными плазмидами, стимулировать клеточный иммунный ответ в культуре МНК, провести анализ цитотоксического потенциала МНК после совместного культивирования с трансфецированными ДК. При сравнении индукции противоопухолевого иммунного ответа в культуре МНК с помощью трансфецированных ДК и ДК, нагруженных опухолевым лизатом, рассмотренные способы индукции оказались сходными по эффективности. Анализ влияния зрелых трансфецированных ДК на экспрессию перфорина МНК *in vitro* продемонстрировал стимулирующее влияние ДК, трансфецированных плазмидой pCI-UB-POLYEP1, на количество лимфоцитов, несущих гранулы перфорина. Таким образом, в результате проведенных исследований автором показана возможность получения зрелых ДК, трансфецированных пиолиэпитопными ДНК-конструкциями, и индукция противоопухолевого иммунного ответа при колоректальном раке с помощью трансфецированных ДК и аутологичных МНК *in vitro*, совместное культивирование которых стимулирует цитотоксическую активность МНК против аутологичных опухолевых клеток и способствует формированию пула цитотоксических перфорин-позитивных клеток.

В четвёртой главе автором проводится обсуждение полученных результатов исследования, где имеет место подробный сравнительный анализ всей совокупности данных, имеющихся в мировой и отечественной литературе, и детальное обсуждение результатов, что дает основания для формирования полноценных выводов.

В заключении автор обобщает обсужденные данные и утверждает, что преимущество применяемого подхода к активации зрелых ДК является отсутствие иммуносупрессии и риска аутоиммунного ответа, а также возможность создания ДК-

вакцины в случаях, когда резекция опухоли, и, следовательно, приготовление лизата аутологичных опухолевых клеток неосуществимы. Кроме того, данный подход открывает возможности для профилактической вакцинации пациентов, предрасположенных к колоректальному раку на основании семейного анамнеза или генетического скрининга.

Выводы целиком вытекают из результатов исследования.

Автореферат и 12 публикаций, в том числе 2 в отечественных журналах, рекомендованных ВАК, полно отражают результаты исследования.

Внедрение результатов исследования

Результаты, полученные в диссертационном исследовании, запатентованы (патент на изобретение № 2507265 от 20.02.2014), и методики, изученные в работе, внедрены в лаборатории молекулярной иммунологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательского института фундаментальной и клинической иммунологии».

Рекомендации по дальнейшему внедрению

Результаты данного диссертационного исследования могут быть рекомендованы для внедрения в клиничко-экспериментальную работу научно-исследовательских медицинских учреждений, занимающихся разработкой методов активной специфической иммунотерапии.

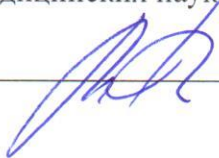
Замечания. В диссертации имеются стилистические неточности и опечатки, что не сказывается на общей положительной оценке данной работы.

Диссертация Куликовой Екатерины Владимировны «Индукция противоопухолевого иммунного ответа *in vitro* дендритными клетками, трансфицированными полиэпитопными ДНК-конструкциями», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, является самостоятельной законченной квалификационной научно-исследовательской работой, в которой содержится решение важной и актуальной задачи – создания и применения ДНК-конструкций, кодирующих эпитопы опухолеассоциированных антигенов, для эффективной индукции клеточного цитотоксического иммунного ответа в культуре мононуклеарных клеток больных колоректальным раком. Выводы и рекомендации достаточно обоснованы. По совокупности критериев работа полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения ВАК МО РФ о порядке присуждения ученых степеней», утвержденным Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. №842, предъявляемым к кандидатским диссертациям на соискание ученой степени кандидата

биологических наук по специальности 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук.

Отзыв заслушан и обсужден на заседании Ученого совета Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт онкологии им. Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, протокол № 10 от «27» октября 2015 г.

Заведующий научным отделом
онкоиммунологии
Федерального государственного
бюджетного учреждения
«Научно-исследовательский институт
онкологии имени Н.Н. Петрова»
Министерства здравоохранения
Российской Федерации,
доктор медицинских наук



И.А. Балдуева

ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России
Адрес: Россия, 197758, Санкт-Петербург
пос. Песочный, ул. Ленинградская, д.68
тел. : (812) 596-8655
эл.адрес oncl@rion.spb.ru

