

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора биологических наук, профессора кафедры патологической анатомии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации Завалишиной Ларисы Эдуардовны на диссертационную работу Подлесной Полины Алексеевны на тему «Роль цитотоксической активности макрофагов в уходе из-под иммунологического надзора клеток опухоли предстательной железы», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 3.1.6. Онкология, лучевая терапия.

Актуальность темы исследования

Рак предстательной железы (РПЖ) является одним из наиболее часто диагностируемых онкологических заболеваний среди мужчин во всем мире. Андрогенная депривационная терапия (АДТ) является стандартом лечения диссеминированного РПЖ. Однако, несмотря на первоначальную эффективность АДТ, при ее длительном применении неизбежно возникает резистентность к данному виду терапии, что приводит к развитию гормононечувствительного фенотипа РПЖ. Последние достижения применения ингибиторов контрольных точек иммунитета как иммунотерапевтической тактики лечения онкологических заболеваний показали хорошие результаты: увеличивается продолжительность и частота объективных ответов у пациентов с различными типами солидных опухолей. Однако в случае РПЖ ингибиторы контрольных точек иммунитета до сих пор не вошли в рутинную клиническую практику. Появление ингибиторов контрольных точек иммунитета обусловлено накопленными данными о роли микроокружения опухоли в прогрессии заболевания. Однако эти данные не получены в полной мере для РПЖ. Представленные данные в контексте микроокружения опухолей данной локализации весьма противоречивы и фрагментарны. Однако тот факт, что микроокружение играет важную роль в прогрессии РПЖ, не вызывает сомнения. Таким образом, изучение фенотипа клеток воспалительного инфильтрата стромы РПЖ и характера их взаимодействия со злокачественно трансформированными клетками является крайне актуальным.

Ингибиторы контрольных точек иммунитета активируют противоопухолевые функции иммунных клеток стромы. В настоящее время наиболее распространенные препараты такого типа направлены на Т-лимфоциты в строме опухоли. Вместе с тем, существующие тактики, направленные на активацию цитотоксической активности опухоль-ассоциированных

макрофагов (МАО), не получили широкого распространения ввиду низкой эффективности. Стоит отметить, что МАО является наиболее многочисленной популяцией опухоль-ассоциированных иммунных клеток. Таким образом, исследования механизмов взаимодействия опухолевых клеток и цитотоксических макрофагов крайне актуальны. Актуальность диссертационной работы Подлесной П.А. «Роль цитотоксической активности макрофагов в уходе из-под иммунологического надзора клеток опухоли предстательной железы», не вызывает сомнений.

Научная новизна

В рамках диссертационной работы Подлесной П.А. разработана уникальная клеточная модель, позволяющая в условиях *in vitro* как изучать механизмы цитотоксической активности макрофагов, так и получать опухолевые клетки, устойчивые к данному воздействию. При помощи разработанной клеточной модели впервые были получены сублинии клеток РПЖ, устойчивые к цитотоксической активности макрофагов. Произведен сравнительный анализ транскриптома, функциональных характеристик полученных устойчивых сублиний по сравнению с контролем. Стоит отметить, что полученные результаты экспериментов на культурах опухолевых клетках подтверждены и на моделях опухолей *in vivo*. Более того, соискатель самостоятельно корректно провел гистологический и иммуногистохимический (ИГХ) анализ опухолей подкожных ксенографтов. В совокупности, полученные данные говорят в пользу того, что под действием цитотоксической активности макрофагов происходит отбор опухолевых клеток, устойчивых к данному воздействию и обладающих более злокачественным фенотипом. Такой тип взаимодействия цитотоксических макрофагов и клеток РПЖ описан впервые, выявленные механизмы формирования устойчивости представляют научную новизну.

В рамках диссертационной работы также произведено масштабное исследование клеток воспалительного инфильтрата опухолевой стромы РПЖ, а также произведен анализ их ассоциаций с клинико-морфологическими характеристиками пациентов. Подлесная П.А. самостоятельно провела ИГХ анализ микропрепаратов 30 случаев РПЖ с использованием 15 маркеров опухолевой стромы, провела сбор и статистический анализ архивных клинических данных. Обработка, анализ и оценка результатов всех исследований, указанных в диссертации, проведены лично Подлесной П.А. Результаты проведенного исследования расширяют понимание о механизмах прогрессии РПЖ. Впервые выявлена ассоциация повышенного содержания CD204⁺ и CD20⁺ иммунных клеток с более старшим возрастом пациентов с РПЖ и ассоциация экспрессии иммуносупрессорных молекул PD-L1 и IDO1 с содержанием Т-регуляторных клеток стромы и макрофагов, ассоциированных с опухолью.

Обоснованность и достоверность полученных результатов, обоснованность выводов и практических рекомендаций

Полученные в диссертационной работе Подлесной П.А. данные основаны на результатах комплексного анализа взаимодействия цитотоксических макрофагов и клеток опухоли предстательной железы. В работе корректно использован широкий спектр современных методов исследования. Данные получены на клеточных моделях *in vitro*, верифицированы на моделях *in vivo*, функции макрофагов в строме РПЖ также исследованы методом ИГХ с использованием большого объема материала, полученном от пациентов с верифицируемым диагнозом. Сбор, систематизация и анализ полученной информации соответствуют современным требованиям, предъявляемым к подобного рода изысканиям. Математическая обработка данных осуществлялась с использованием современных программных пакетов GraphPadPrizm 8.0. Полученные результаты сопоставлены с имеющимися данными отечественного и зарубежного опыта по изучению роли цитотоксических макрофагов в изменении свойств опухолевых клеток различных нозологий.

Стоит отметить широкое обсуждение результатов представленной диссертационной работы на всероссийских конференциях с международным участием. Полученные данные также были опубликованы в рецензируемых научных изданиях, в том числе из перечня ВАК.

Преодоление формирования устойчивости опухолей к лечению – один из наиболее актуальных вопросов современной онкологии. В рамках представленной работы впервые получены сублинии клеток РПЖ, устойчивые к цитотоксической активности макрофагов. Описаны механизмы формирования устойчивости и потенциальные способы их регулирования. Полученные данные могут быть актуальны для разработки методов возвращения чувствительности опухолевых клеток к иммунному ответу. Выводы и практические рекомендации логичны и полностью обоснованы полученными результатами.

Таким образом, высокий научно-профессиональный уровень проведения исследования и изложения полученных данных дает основание считать представленные Подлесной П.А. результаты и практические рекомендации обоснованными и достоверными.

Структура и содержание диссертации

Диссертационная работа Подлесной П.А. построена по традиционной схеме, изложена на 146 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, главы, посвященной описанию используемых материалов и методов, описания полученных результатов, их обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений и списка литературы. Работа иллюстрирована 36 рисунками и содержит 14 таблиц. Список литературы включает 282 источника литературы.

В главе «**Введение**» автор обосновывает актуальность проблемы, которой посвящено исследование, формулирует цель и задачи исследования, описывает научную новизну, теоретическую и практическую значимость проведенного исследования, методы и методологию исследования, формулирует положения, выносимые на защиту, обосновывает достоверность полученных результатов.

В главе «**Обзор литературы**» представлен анализ отечественных и зарубежных литературных источников и содержится информация об имеющихся на сегодняшний день данных по изучаемой проблеме. В частности, достаточно подробно описаны биологические функции макрофагов и их роль в канцерогенезе. Также описаны существующие терапевтические методики, направленные на МАО. Представлены данные об эпидемиологии и рутинных методах лечения РПЖ. Содержание обзора литературы свидетельствует о глубоком и всестороннем анализе автором тематики представленного исследования.

В главе «**Материалы и методы**» дано подробное описание применяемых молекулярно-биологических, клеточных и иммунологических методик, методов статистического анализа. Автор использовал широкий спектр современных методов исследования. Методология подобрана грамотно в соответствии с решением поставленных задач.

Глава «**Результаты исследования**» состоит из 8 основных разделов, в которых лаконично и подробно представлены все результаты проведенного исследования. Первый и второй разделы посвящены подбору условий для создания клеточной модели. Результаты логичны и согласуются с имеющимися литературными данными. Разделы 3 и 4 посвящены описанию роли цитотоксической активности макрофагов в формировании устойчивости опухолевых клеток РПЖ к данному воздействию при контакт-зависимом и не зависящем от прямого взаимодействия методах сокультивирования опухолевых клеток и макрофагов. Сделан обоснованный вывод о том, что только при контактом методе культивирования развивается устойчивость опухолевых клеток к цитотоксическому действию макрофагов. В разделах 5-7 представлены результаты по исследованию транскриптома, *in vitro* и *in vivo* характеристик полученных устойчивых сублиний РПЖ в сравнении с контролем. В разделе 8 представлены результаты комплексного изучения фенотипа стромальных иммунокомпетентных клеток РПЖ, их корреляций между собой и ассоциаций с клинико-морфологическими характеристиками заболевания. Все результаты проиллюстрированы многочисленными таблицами, графиками и микрофотографиями хорошего качества.

В главе «**Обсуждение результатов**» автор подробно анализирует полученные данные. Все полученные результаты подробно обсуждены и сопоставлены с наиболее актуальной мировой научной литературой последних лет. Полученные данные свидетельствуют об актуальности и перспективности данного исследования.

В главе «**Заключение**» автор подводит итог результатов проведенного исследования и подчеркивает его актуальность.

Диссертационная работа содержит 7 выводов, которые четко сформулированы, резюмируют полученные данные и соответствуют поставленным задачам.

Замечания, возникшие при анализе диссертации Подлесной П.А. не снижают ценности, важности, новизны и актуальности представленного исследования:

1. при анализе результатов иммуногистохимического исследования было бы желательно провести полуколичественную оценку экспрессии иммуногистохимических маркеров, таких как CD3, CD8, PD-L1, Ki67 на парафиновых срезах опухолей с указанием в процентах количества позитивных клеток к общему количеству клеток опухоли и/или стромы;
2. при изучении уровня экспрессии PD-L1 для объективизации анализа результатов данного параметра надо было бы ввести показатель порогового значения для четкого определения позитивного и негативного статуса опухоли;
3. исследование экспрессии MMP9 молекулярно-генетическими методами дополнить изучением экспрессии данной металлопротеиназы на парафиновых срезах исследованных карцином предстательной железы иммуногистохимическим методом.

Определение указанных параметров помогло бы получить дополнительную информацию в данном очень перспективном исследовании.

Соответствие содержания автореферата основным положениям диссертации

Автореферат составлен в соответствии с существующими требованиями и в полной мере отражает содержание диссертации, ее научную новизну и практическую значимость.

Заключение

Диссертация Подлесной П.А. на тему: «Роль цитотоксической активности макрофагов в уходе из-под иммунологического надзора клеток опухоли предстательной железы» является законченной, самостоятельной научной-квалификационной работой, выполненной на высоком научном и методическом уровне с использованием современных методов исследования, в которой на основании выполненных автором исследований и разработок осуществлено решение актуальной научной задачи, а именно описан новый тип взаимодействия M1 макрофагов и опухолевых клеток, приводящий к развитию резистентности последних к цитотоксическому действию макрофагов. Определены механизмы формирования данного вида

резистентности и предложены способы их регулирования. Описана роль макрофагов стромы РПЖ в патогенезе заболевания. Результаты проведенного исследования имеют важное значение для развития современной онкологии. Диссертационная работа соответствует всем 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, от 26 октября 2023 года №1786), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата 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, созданного на базе ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России

Профессор кафедры патологической анатомии
ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России,
доктор биологических наук, профессор
(14.00.14. Онкология)



Завалишина Лариса Эдуардовна

«20» февраля 2024г

Подпись д.б.н. Завалишиной Л.Э. «заверяю»

Ученый секретарь
ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России
доктор медицинских наук, профессор



Чеботарёва Татьяна Александровна

«20» февраля 2024

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение дополнительного профессионального образования "Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования" Министерства здравоохранения Российской Федерации
Адрес: Российская Федерация, 125993, г. Москва, ул. Баррикадная, дом 2/1, строение 1. Тел. +7 (495) 680-05-99, mail: rmanpo@rmanpo.ru, <https://rmanpo.ru/>