

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук, профессора, член-корреспондента Российской академии наук Чердынцевой Надежды Викторовны на диссертационную работу Подлесных Степана Васильевича «Исследование репертуара циркулирующих антител и белок-белковых взаимодействий с использованием пептидных микрочипов», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия

Актуальность работы.

Прирост онкологической заболеваемости является объективным процессом, в связи с изменением демографической обстановки – а именно с увеличением доли пожилых людей, а также совершенствование диагностики рака приводит к повышению числа пациентов с онкологическим диагнозом. Однако есть принципиальные возможности для снижения смертности за счет выявления опухолей на ранних стадиях, и, следовательно, более успешного лечения пациентов, а также разработка персонализированной лекарственной терапии с использованием химиотерапии, иммунотерапии и других модальностей.

Рак молочной железы занимает первое место по заболеваемости и смертности среди женщин в мире и Российской Федерации в том числе. Известно, что злокачественные опухоли у каждого индивидуума являются гетерогенными по составу паренхиматозного и стромального компонентов. Внутриопухолевая гетерогенность влияет на особенности клинического течения заболевания и является важным фактором, определяющим ответ на противоопухолевую терапию. В литературе в достаточной мере описана неоднородность клеточного строения опухолей молочной железы и представлены многообразные факторы, провоцирующие опухолевый рост и влияющие на течение заболевания. В их число входит иммунная система – мультифункциональный регулятор целостности организма на клеточном уровне, вносящая вклад в формирование и прогрессию опухолей, и следовательно, оценка ее взаимодействия с опухолью может быть перспективной как в плане разработки новых маркеров, так и методов иммуноопосредованной противоопухолевой терапии. Несмотря на развитие научных направлений по иммунотерапии, пока не удалось достигнуть высокой эффективности, в определенной мере это связано с несовершенством систем детекции иммунологических маркеров. Автор предлагает в качестве оригинального инструмента новый класс пептидных микрочипов как для диагностики опухолевого процесса, так и в качестве основы для создания новых иммунопрепаратов.

Исходя из этого, автор формулирует цели работы – разработать методику, которая позволила бы проводить обнаружение дифференциальных иммуносигнатур в крови пациентов на разных стадиях рака, и оценивает возможности стимулирования собственного иммунитета пациента, путем выключения ингибиторной молекулы, для уничтожения опухоли.

Автор говорит о двух концепциях, но в действительности это объединенный путь – распознавание и уничтожение опухолей на ранней стадии. Роль иммунной системы в патогенезе рака, как на стадиях формирования, так и в период опухолевой прогрессии, и как достоверно показано, в обеспечении эффективности химиотерапии, - все это говорит об актуальности проведенной автором работы.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

В первой части работы представлены результаты исследования репертуара циркулирующих антител плазмы крови пациентов с диагнозом рак молочной железы, для выявления пептидов классификации больных раком и здоровых доноров.

В качестве эффективного инструмента автор использовал современную технологическую платформу пептидных микрочипов высокой плотности. Этот метод позволяет обеспечить возможности массового параллельного анализа, необходимого для картирования всего протеома, профилирования репертуара циркулирующих антител или для реализации современных программ по открытию и разработке новых лекарственных препаратов. Измерение иммунофлуоресценции дает возможность оценить уровень антител для того или иного пептида и выявить те, которые обнаруживаются у больных раком, но не у здоровых. Авторы идентифицировали 119 пептидов, по которым можно различить больных и здоровых и показали высокую чувствительность и специфичность классификаторов. Важны результаты, свидетельствующие о разных сигнатурах при разных молекулярных подтипах опухоли, что отражает различия молекулярной природы разных опухолей и специфику вовлечения иммунной системы. Можно говорить о высокой диагностической ценности теста, но пока без доказательств его способности выявлять опухоли до их клинической манифестации.

Во второй части проведено изучение белок-белковых взаимодействий, на примере молекулы CTLA-4, с помощью пептидных микрочипов. Получены приоритетные данные о гомологии ряда пептидов с белками онкогенеза. Также имеют большую значимость находки пептидов, в том числе синтезированных автором, специфичных для

иммунорегуляторной молекулы CTLA-4, которые дают основания для оценки возможности создания на их основе иммунопрепаратов.

Обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций, представленных в диссертационной работе Подлесных С.В., обусловлена актуальностью проводимых исследований, корректно сформулированной целью работы и постановкой адекватных задач, которые необходимо было решить для ее достижения. Научные положения и выводы обеспечены достаточным объемом исследований, обширной методической базой, включающей в себя биохимические и молекулярные методы исследования, а также применением современных статистических и биоинформатических подходов для корректного анализа полученных данных.

Достоверность и новизна научных положений, выводов и рекомендаций

В работе впервые проанализированы возможности использования пептидных микрочипов высокой плотности для оценки репертуара антител в крови больных раком молочной железы и продемонстрирована их диагностическая ценность. Впервые определены последовательности и структуры пептидов (мимотопов), которые взаимодействуют с антителами плазмы крови и имеют потенциал для трансляции с целью создания диагностических тест-систем. Впервые с помощью пептидных микрочипов нового поколения, приготовленных с применением оригинального метода фотолитографии для синтеза пептидов на микрочипе, содержащих более 300 тысяч пептидов, определен дифференциальный профиль циркулирующих антител в плазме крови больных раком молочной железы, с разными молекулярными подтипами опухоли, в зависимости от рецепторного статуса опухоли.

Впервые определены пептиды, специфически взаимодействующие с молекулой CTLA-4, негативным регулятором иммунных реакций. Впервые выявлен синтетический пептид, способный блокировать взаимодействие рецептора CTLA-4 с его природным лигандом В7-1. Данные пептиды могут быть основой для разработки лекарственных препаратов для иммунотерапии онкологических и инфекционных заболеваний, с помощью усиления функциональной активности Т-лимфоцитов. Достоверность данных подтверждается корректным дизайном, ясной формулировкой задач, современным инструментарием исследований, включая математические подходы анализа данных.

Теоретическая и практическая значимость

Исследование направлено на решение актуальной задачи, включающей изучение иммунологических сигнатур опухолей молочной железы на платформе пептидных микрочипов и выявление пептидов, специфически взаимодействующих с регуляторной молекулой CTLA-4. Работа имеет научную значимость как в фундаментальном так и практическом аспекте. Выявление различий репертуара антител у пациентов с различными характеристиками процесса подтверждает теоретические умозаключения об активном участии иммунной системы в онкогенезе, отражающей молекулярные особенности новообразования. Определение общих аминокислотных последовательностей пептидов, взаимодействующих с антителами в крови, независимо от подтипа опухоли, позволило установить их гомологию с белками, вовлеченными в онкогенез. Это новые знания о закономерностях вовлечения иммунологических факторов в формирование опухоли. Синтез специфичных к молекуле иммунорегуляции CTLA-4 пептидов открывает, во-первых, возможность разработки на его основе ингибитора контрольной точки, во-вторых, может быть полезен в технологической цепочке производства анти CTLA-4 антител для контроля специфичности. И что особенно важно – это возможность трансфера этой технологии на другие локализации злокачественного процесса.

Основное содержание работы

Диссертационная работа изложена на 203 страницах, включает 38 рисунков, 9 таблиц. Список литературы содержит 287 источников. Диссертация имеет следующую структуру: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы». В соответствии с правилами оформления представлены список литературы и приложения.

Во введении автор обосновывает актуальность исследуемой проблемы, обозначает цель и задачи исследования, формулирует научную новизну и теоретическую и практическую значимость излагаемой работы. Положения, выносимые на защиту, сформулированы корректно.

Литературный обзор основан на анализе современных литературных данных, изложен понятным и доступным языком. Освещена проблема отсутствия эффективных маркеров ранней диагностики рака молочной железы. Подробно охарактеризованы результаты использования и возможности систем для определения антител в крови, указаны их достоинства и недостатки, что требует для исправления недостатков разработки простых и надежных методов детекции антител в циркуляции. Дана

характеристика пептидных микрочипов и обоснованы предпосылки их использования для диагностики рака. Представлены данные о роли иммунной системы в формировании и прогрессии опухоли, что служит доказательством перспектив использования ее показателей и факторов для диагностики злокачественного процесса, с одной стороны, и оценки возможности разработки оригинальных иммуно направленных препаратов для лечения рака.

В финальной части обзора литературы автор подчеркивает необходимость разработки новых платформ оценки аутоантител в крови, установления их диагностической значимости, а также проведения исследований по поиску пептидов с ингибирующей активностью в отношении молекул негативного контроля иммунного ответа. Все это обозначило цель и задачи работы.

Глава «Материалы и методы» традиционно посвящена характеристике клинического материала и методов исследования. Работа носит биохимическую направленность и посвящена характеристике новой платформы - пептидных микрочипов высокой плотности в отношении тестирования антител в крови больных раком в качестве диагностического теста. Методические подходы включают такие современные инструменты, как иммуногистохимия, иммунофлюоресценция, молекулярный докинг, моделирование пептидов, их химический синтез с анализом физико-химических свойств, адекватный набор статистических и биоинформатических подходов. Дано полное описание использованных в диссертационной работе методов. Их совокупность наряду с грамотным дизайном позволила решить поставленные задачи.

Глава «Результаты исследования и их обсуждение» включает в себя характеристику и анализ собственных результатов. В данном разделе подробно изложены результаты анализа аутоантител с использованием пептидных микрочипов у больных раком, найдены кластеры пептидов, различающие здоровых лиц и больных раком, с учетом молекулярного подтипа заболевания. Высокая чувствительность и специфичность классификатора указывает на перспективу создания диагностического теста. В ходе работы найдено 19 пептидов, реагирующих с ингибиторной молекулой CTLA-4 и синтезированы 8 пептидов, распознающих данную молекулу. На основе этого с использованием математического моделирования предложен оптимальный вариант пептида, реагирующий с определенной петлей аминокислоты в исследуемой молекулы, что приводит к блокированию связи рецептора с его лигандом B7-1, и следствием такого взаимодействия может быть наличие полноценного иммунного ответа на опухоль. Здесь можно говорить о высокой перспективе трансляции результатов для разработки

специфического ингибитора контрольных иммунных точек на основе отмеченного пептида.

В «Заключении» к диссертационной работе автор провел обобщение изложенного материала, в сжатой форме представлены анализ и обсуждение полученных данных.

Диссертацию завершают пять выводов, полностью соответствующие поставленной цели и задачам, в которых отражены основные результаты исследования. Выводы обоснованы полученными результатами.

Автором сформулированы практические рекомендации, которые указывают на возможность применения результатов исследования в лечебных учреждениях онкологического профиля.

Таким образом, работа С.В. Подлесных посвящена актуальному направлению по изучению роли иммунной системы при онкологической патологии, в целом этот вопрос включает в себя фундаментальные аспекты онкоиммунологии и возможности практического использования иммунологических маркеров диагностики, прогноза и создания иммунотерапевтических подходов. Автор показал значимость использования новой платформы пептидных микрочипов для определения иммуносигнатур у больных раком молочной железы в диагностических целях, также получены новые данные о различии сигнатур у пациентов с разными молекулярными особенностями процесса. Среди пептидов выявлены гомологи белков онкогенеза, а также выбранные и вновь синтезированные пептиды, реагирующие с молекулой негативного контроля иммунного ответа, и обоснован возможный пептидный прототип ингибитора контрольной точки. Использование оригинальной панели широкого спектра пептидов, правильная стратификация групп сравнения, величина выборок исследуемых пациентов, синтез нового пептида и оценка его физико-химических свойств, проверка эффективности взаимодействия с выбранной молекулярной мишенью, корректная интерпретация данных, - все это является достаточным для корректного формулирования представленных выводов и выносимых на защиту положений. Получены новые знания и показана перспектива трансляции результатов в клинику. В качестве дискуссии хотелось бы отметить, что выявление на ранней стадии предполагает визуализацию опухолевого очага для его удаления, поскольку лекарственное лечение (предоперационная химиотерапия) назначается по клиническим показаниям, только части пациентов. Следует отметить очень важное обстоятельство, снижающее полезность скрининга, а именно то, что далеко не всякая опухоль будет прогрессировать (будучи в дремлющем состоянии), и терапевтическая интервенция нужна не для каждой пациентки при обнаружении опухоли

на ранней стадии. Здесь видится применение в будущем платформы пептидных микрочипов для распознавания опухолей с разным потенциалом прогрессии, для которых будут характерны разные иммуносигнатуры. Это поможет сократить терапевтическую гиперинтервенцию пациентов с раком молочной железы, диагностированным на ранних стадиях.

По теме диссертации опубликовано 20 печатных работ, отражающих основные положения диссертации, из них 11 - статьи в периодических изданиях, рекомендованных ВАК РФ, из них 6 статей в журналах, индексируемых в базах научного цитирования Scopus и Web of Science. Основные результаты обсуждены автором на научных конференциях российского и зарубежного уровня.

Автореферат отражает содержание диссертационной работы, оформлен в соответствии с требованиями ВАК.

Принципиальных замечаний по работе не имею. В порядке дискуссии хотелось бы обсудить следующее:

1. В чем выражаются различия между пептидами, связывающими молекулу CTLA-4?
2. Поясните, как Вы видите использование результатов Вашей работы с точки зрения ранней диагностики рака молочной железы. Что для этого следует сделать?
3. Какие результаты вы расцениваете как перспективу для разработки нового типа ингибиторов иммунного ответа на основе пептидов?

Заключение

Диссертационная работа Подлесных Степана Васильевича «Исследование репертуара циркулирующих антител и белок-белковых взаимодействий с использованием пептидных микрочипов», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04–биохимия, является законченным научным трудом, в котором решена важная для биохимии задача – показана целесообразность использования оригинальных пептидных микрочипов для диагностики рака, найдены и синтезированы пептиды, способные служить основой для разработки новых ингибиторов контрольных точек иммунитета.

В целом, по своей актуальности, научной новизне и практической значимости результатов, полученных на современном методологическом уровне, диссертационная работа Подлесных С.В. соответствует требованиям «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 02 августа 2016 г. № 748, от 29 мая 2017 г. № 650, от 28 августа 2017 г. № 1024 и от 01 октября 2018 г. № 1168), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04– биохимия

Дано свое согласие на сбор, обработку, хранение и передачу персональных данных в диссертационный совет Д 001.048.04 на базе ФГБУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины»

Официальный оппонент
Доктор биологических наук (14.03.03 –
патологическая физиология),
профессор (14.01.12 – онкология)
член-корреспондент РАН, заведующая лабораторией
молекулярной онкологии и иммунологии,
заместитель директора по научной работе
научно-исследовательского института онкологии
федерального государственного бюджетного
научного учреждения «Томский национальный
исследовательский медицинский центр
Российской академии наук»
Подпись член-корреспондента РАН
профессора Чердынцевой Н. П.

Чердынцева Надежда Викторовна

29.04.2021г.

Ученый секретарь
федерального государственного
бюджетного научного учрежден.
национальный исследовательский
медицинский центр Российской ака
кандидат биологических наук



Ирина Юрьевна

Федеральное государственное бюджетное
исследовательское учреждение «Томский национальный
исследовательский медицинский центр»
634009, г. Томск, пер. Кооперативный, до
тел.: 8(3822)51-33-06;
e-mail: center@tnimc.ru;
сайт: www.tnimc.ru

«Томский национальный
исследовательский медицинский центр»