

ОТЗЫВ

**официального оппонента доктора биологических наук
Анисимовой Натальи Юрьевны на диссертационную работу
Ушаковой Екатерины Игоревны «Экспериментальная
иммунотерапия злокачественного новообразования путем
перепрограммирования миелоидных клеток в модели
метастатической карциномы у лабораторных мышей» на соискание
ученой степени кандидата биологических наук по специальности**

3.2.7. Иммунология

Актуальность темы диссертации

Диссертационная работа Е.И. Ушаковой посвящена актуальной и интенсивно развивающейся области современной иммунологии — изучению механизмов противоопухолевого иммунного ответа и разработке новых подходов к иммунотерапии злокачественных новообразований.

В последние годы убедительно показано, что ключевую роль в прогрессии опухолей играет иммуносупрессивное микроокружение, формируемое, в том числе, за счёт миелоидных клеток — макрофагов, дендритных клеток и миелоидных супрессорных клеток. Указанные популяции способны подавлять противоопухолевый иммунитет посредством продукции иммуносупрессивных факторов и экспрессии ингибирующих молекул, что приводит к функциональной инактивации Т - лимфоцитов.

В этой связи особый интерес представляет разработка стратегий, направленных на качественное изменение свойств клеток микроокружения опухолей с целью усиления их противоопухолевой активности. Одним из перспективных направлений является использование агонистов Toll-подобных рецепторов (TLR), способных индуцировать активацию врождённого иммунитета и запуск каскадов, приводящих к формированию адаптивного противоопухолевого ответа.

Следует отметить, что несмотря на значительное количество исследований, посвящённых изучению TLR-сигналинга, отдельные аспекты механизма его влияния на противоопухолевый ответ остаются

недостаточно изученными. Это определяет научную новизну и актуальность представленной диссертационной работы.

Таким образом, диссертационное исследование Е.И. Ушаковой, направленное на изучение механизмов действия агонистов TLR3 и TLR4 и разработку экспериментальной иммунотерапии метастатического рака молочной железы, является несомненно актуальным.

Соответствие темы диссертации паспорту научной специальности

Диссертационная работа соответствует специальности «3.2.7. Иммунология» (биологические науки): (направления исследований: №2; №3; №6).

Основные результаты диссертационной работы

Научная работа Е.И. Ушаковой выполнена на высоком методическом уровне и направлена на изучение механизмов противоопухолевого действия иммунотерапии, основанной на перепрограммировании миелоидных клеток.

Автором разработана и экспериментально обоснована воспроизводимая модель метастатической карциномы молочной железы 4T1 у лабораторных мышей, включающая проведение иммунотерапии после хирургического удаления опухоли. В работе показано, что применение агонистов TLR сопровождается выраженным терапевтическим эффектом: полное излечение достигается у 50% животных при использовании TLR3 и TLR4 агонистов, что доказано на 421 животном. При этом отмечается значительное снижение или полная элиминация метастатических очагов в лёгких. Так, установлено, что ключевым механизмом противоопухолевого действия является перепрограммирование миелоидных клеток, приобретающих цитотоксический фенотип и способных эффективно уничтожать опухолевые клетки в ткани легких.

Проведено детальное исследование влияния терапии агонистами TLR на различные звенья иммунной системы. Оценен клеточный состав органов иммунной системы, включая дренирующие опухоль лимфатические узлы,

селезенку, а также опухоль и орган-мишень метастазирования легкие с анализом популяций CD3-, CD4-, CD8-T-клеток, НК- и В-клеток, а также различных субпопуляций миелоидных клеток. При изучении динамики антиген-специфических Т-клеток, автор убедительно доказывает, что TLR-активированные миелоидные клетки способствуют увеличению интенсивности иммунных реакций антиген-специфических Т-клеток во вторичных лимфоидных органах.

Автором приведено сравнение динамики противоопухолевых IgG-антител, специфичных к антигенам клеток карциномы 4Т1 при отсутствии и использовании экспериментального подхода. Убедительно показано, что у мышей с карциномой 4Т1 противоопухолевые антитела не образуются, что говорит о подавлении гуморального звена иммунитета и иммуносупрессии. Так, автором было показано, что иммунотерапия перепрограммирования миелоидных клеток агонистами TLR3 и TLR4 после хирургического удаления опухоли инициировала продукцию противоопухолевых IgG-антител, которые становились заметными через 3 недели после начала иммунотерапии, что доказано двумя экспериментальными методами.

Особого внимания заслуживают данные о формировании долговременной иммунной памяти, проявляющейся в подавлении роста повторно инокулированной опухоли и сохранении противоопухолевого фенотипа миелоидных клеток. Детальный анализ показал формирование опухолеспецифических CD4- и CD8-T-клеток памяти, способных продуцировать ИФН- γ , а также цитотоксических CD8-T-лимфоцитов с выраженной противоопухолевой активностью.

Таким образом, полученные результаты убедительно демонстрируют высокую эффективность предложенного иммунотерапевтического подхода.

Достоверность полученных результатов

Диссертационная работа выполнена на высоком научном и методическом уровне на сертифицированном оборудовании с применением

современных методов исследования, адекватных поставленным цели и задачам. Все исследования грамотно спланированы, проведены на значительном количестве биологических объектов (было использовано 745 мышей), результаты обработаны с применением адекватных статистических методов с обоснованием их достоверности.

Научная новизна диссертационной работы

В диссертационной работе получен ряд новых научных данных, существенно дополняющих современные представления о механизмах противоопухолевого иммунного ответа при метастатическом процессе в условиях иммунотерапии, направленной на функциональное изменение клеток врождённого иммунитета.

Впервые проведено системное исследование иммунных реакций организма при использовании агонистов TLR3 и TLR4 в модели метастатической карциномы 4T1, позволившее охарактеризовать вклад как врождённого, так и адаптивного звеньев иммунитета в реализацию противоопухолевого эффекта. Показано, что введение агонистов TLR в послеоперационном периоде сопровождается выраженной активацией T-клеточного иммунного ответа с вовлечением CD4⁺- и CD8⁺-T-лимфоцитов в лимфоидных органах, что отражает формирование системной иммунной реакции.

На основе полученных данных установлено, что воздействие агонистов TLR3 и TLR4 приводит к глубокой функциональной перестройке миелоидных клеток, снижая риск метастазирования и возникновения повторных опухолей. Продемонстрировано, что тканевые макрофаги и дендритные клетки, в том числе локализованные в лёгочной ткани, приобретают устойчивый цитотоксический фенотип и способны непосредственно участвовать в элиминации опухолевых клеток.

Сформулировано положение о ведущей роли перепрограммированных миелоидных клеток в поддержании противоопухолевой активности иммунной системы в условиях метастатического поражения. Показано, что указанные клетки сохраняют функциональную активность при повторном опухолевом росте, что

указывает на их участие в механизмах долговременного иммунного контроля.

Впервые получены данные, свидетельствующие о формировании стойкой иммунологической памяти, включающей популяции антиген-специфических CD4⁺- и CD8⁺-Т-клеток памяти, а также В-клеток, обеспечивающих продукцию IgG-антител, что доказано долгим периодом наблюдения в 250 дней. Установлено, что индукция данного эффекта возможна за счёт воздействия на клетки врождённого иммунитета без прямой стимуляции лимфоцитов.

Полученные результаты расширяют представления о координирующей роли миелоидных клеток в противоопухолевом иммунитете и создают основу для дальнейшего развития направлений иммунотерапии, ориентированных на их функциональное перепрограммирование.

Теоретическая значимость диссертационной работы

Теоретическая значимость диссертационной работы определяется расширением и углублением представлений о механизмах иммунологического контроля опухолевого роста при направленном воздействии на клетки врождённого иммунитета.

В результате проведённого исследования получены новые данные о роли TLR3- и TLR4-зависимых сигнальных путей в формировании интегрального противоопухолевого ответа. Установлено, что активация данных рецепторов инициирует каскад иммунных реакций, приводящих к развитию антиген-специфического Т-клеточного ответа и продукции IgG-антител, направленных против опухолевых антигенов, что отражает координированное взаимодействие клеточного и гуморального звеньев иммунитета.

Существенное значение для развития теоретической иммунологии имеют результаты, раскрывающие функциональную пластичность миелоидных клеток. Показано, что под влиянием агонистов TLR тканевые макрофаги и дендритные клетки переходят в активированное состояние с приобретением выраженных эффекторных свойств, включая цитотоксическую активность в отношении опухолевых клеток 4T1.

Установлено, что данные клетки способны участвовать в ограничении метастатического процесса и сохранять противоопухолевую направленность при повторном развитии опухоли, что сопровождается повышенной экспрессией генов *Nos2*, *Il1b* и *Tnf*.

Отдельный теоретический интерес представляют полученные данные о механизмах формирования долговременного иммунного ответа. Показано, что индукция устойчивой Т- и В-клеточной памяти возможна за счёт воздействия на клетки врождённого иммунитета без прямой стимуляции лимфоцитарного звена. Выявленная способность перепрограммированных миелоидных клеток опосредованно формировать иммунологическую память принципиально расширяет существующие представления о путях её возникновения.

Таким образом, результаты диссертационной работы дополняют современные концепции противоопухолевого иммунитета, уточняют роль миелоидных клеток как активных регуляторов иммунного ответа и формируют теоретическую основу для разработки новых направлений иммунотерапии, ориентированных на их функциональную модификацию.

Практическая значимость диссертационной работы

Практическая значимость диссертационной работы Е.И. Ушаковой определяется возможностью использования полученных результатов для разработки новых подходов к иммунотерапии метастатических злокачественных новообразований, основанных на целенаправленном воздействии на эффекторы противоопухолевого иммунитета.

В ходе научного исследования показано, что применение агонистов TLR3 и TLR4 сопровождается выраженным снижением метастатического поражения лёгких, в отдельных случаях — полной элиминацией метастазов, а также увеличением выживаемости животных до 50%. Полученные данные свидетельствуют о перспективности использования данного подхода при моделировании терапевтических стратегий, направленных на контроль метастатического процесса.

Установлено, что противоопухолевый эффект реализуется за счёт изменения функционального состояния миелоидных клеток. Показано, что макрофаги и дендритные клетки приобретают свойства эффекторных

клеток с выраженной цитотоксической активностью и способны сохранять её в условиях опухолевого микроокружения. Данные результаты имеют значение для разработки направлений терапии, ориентированных на коррекцию иммунного ответа при опухолевом росте.

Практическую ценность представляют результаты, характеризующие формирование системного противоопухолевого иммунного ответа с вовлечением клеточного и гуморального звеньев, а также развитие длительной иммунологической памяти, обеспечивающей контроль над опухолевым процессом при его повторном возникновении. Полученные данные могут быть использованы при разработке критериев оценки эффективности иммунотерапии. Показана возможность применения иммунологических показателей, включая характеристики Т-клеток памяти и продукцию опухолеспецифических антител, в качестве дополнительных ориентиров при анализе противоопухолевого ответа.

Разработанная методика количественной оценки антиген-специфических CD4⁺- и CD8⁺-Т-клеток памяти обладает достаточной чувствительностью и воспроизводимостью и может быть рекомендована для использования в экспериментальных исследованиях, а также при анализе биологического материала.

Отдельное значение имеют результаты, полученные в экспериментах с клетками человека, подтверждающие способность агонистов TLR3 и TLR4 индуцировать формирование макрофагов и дендритных клеток с противоопухолевой активностью, что позволяет рассматривать данный подход как перспективное направление для дальнейших исследований.

Таким образом, результаты диссертационной работы могут быть использованы при разработке новых иммунотерапевтических стратегий, направленных на повышение эффективности лечения метастатических форм злокачественных новообразований.

Общая характеристика диссертационной работы

Диссертационная работа изложена на 182 страницах текста и имеет традиционную структуру, включающую «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение результатов», «Закключение», «Выводы», «Список сокращений», «Список литературы» и

«Приложение». Работа прекрасно иллюстрирована, содержит схемы, 33 рисунка и 7 таблиц. Библиографический список включает 179 источников, из которых 21 работы отечественных исследователей и 158 зарубежных.

Во введении обоснована актуальность исследования, сформулированы цель и задачи, отражены научная новизна, теоретическая и практическая значимость, основные положения, выносимые на защиту. Обзор литературы выполнен на высоком уровне и содержит систематический анализ современных данных по теме исследования. Раздел «Материалы и методы» подробно описывает используемые экспериментальные подходы. Результаты исследования изложены последовательно, логично и сопровождаются необходимыми иллюстрациями. Обсуждение отражает глубокий анализ полученных данных и их сопоставление с литературными источниками.

Выводы полностью обоснованы результатами исследования и четко сформулированы. Рекомендации логично вытекают из содержания диссертации, аргументированы и имеют научно-практическую значимость.

Материалы диссертации апробированы на научных конференциях.

Основные результаты диссертации опубликованы в 15 научных работах, включая 7 статей в рецензируемых периодических научных изданиях, рекомендованных для публикации основных научных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата, 8 публикаций в материалах конгрессов и конференций.

Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

В ходе рецензирования текста диссертации возникли следующие вопросы к автору:

1. Чем был обусловлен выбор антитела анти CD49 для идентификации натуральных киллеров (раздел 3.1. Результаты), тогда как обычно для идентификации этой субпопуляции используют антитела против CD16 и CD56? Почему для идентификации Т-регуляторных клеток, наряду с CD3 и CD4, не изучалась экспрессия внутриклеточного фактора транскрипции FOXP3?

2. С какой целью для сбора клеток миелобластного лейкоза линии K562, меченных GFP, использовали трипсин-ЭДТА?
3. Каков предположительный механизм "перепрограммирования" цитотоксической активности ДК и макрофагов легких интактных мышей, которым всего за 2 часа до выделения клеток и начала коинкубации с опухолевыми клетками однократно вводили агонисты TLR, и, следовательно, вероятность завершения трансформации этих клеток в подтипы M1 и D1 невелика?
4. Рассуждая о перспективах клинического применения иммунотерапии с агонистами TLR, можно ли говорить о том, что этот подход может быть применен для лечения широкого круга пациентов после резекции первичного опухолевого узла поскольку он не требует обнаружения мишеней на опухолевых клетках, воздействуя только на иммунокомпетентные клетки пациента?

Заключение

Диссертационная работа Ушаковой Екатерины Игоревны «Экспериментальная иммунотерапия злокачественного новообразования путем перепрограммирования миелоидных клеток в модели метастатической карциномы у лабораторных мышей» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности «3.2.7. Иммунология» (биологические науки) является научно-квалификационной работой, в которой решены важные научные задачи, имеющие существенное значение для иммунологии – получены новые данные, характеризующие изменение функционального состояния тканевых макрофагов и дендритных клеток под действием агонистов TLR3 и TLR4 с формированием у них способности реализовывать цитотоксические эффекты в отношении метастатических клеток карциномы 4T1 в органах-мишенях; установлены особенности формирования адаптивного противоопухолевого иммунного ответа при использовании данного подхода, включая активацию Т-клеточного звена в лимфоидных органах и усиление гуморальных иммунных реакций; получены данные о развитии

длительной иммунологической памяти, специфичной к опухолевым антигенам карциномы 4Т1, реализующейся за счёт формирования популяций Т- и В-клеток памяти; показано, что перепрограммирование миелоидных клеток в послеоперационном периоде сопровождается снижением метастатического поражения лёгких и в экспериментальной модели обеспечивает увеличение выживаемости животных до 50%; обоснована эффективность использования агонистов TLR3 и TLR4 с целью формирования устойчивого противоопухолевого ответа.

Диссертационная работа Ушаковой Е.И. полностью соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям (п. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г. в актуальной редакции), а ее автор заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности «3.2.7. Иммунология» (биологические науки).

Официальный оппонент:

ведущий научный сотрудник

лаборатории клеточного иммунитета и биотехнологий

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»

Минздрава России

доктор биологических наук

Анисимова Наталья Юрьевна

Подпись д.б.н. Н.Ю. Анисимовой заверяю:

Ученый секретарь

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»

Минздрава России, к.м.н.



Кубасова Ирина Юрьевна

«24» апреля 2026 г.

Контактная информация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н. Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Адрес: 115522, Российская Федерация, г. Москва, Каширское ш., д. 24.

Тел.: +7(499) 444-24-24, e-mail: info@ronc.ru, сайт: <https://www.ronc.ru>