

## **ОТЗЫВ**

официального оппонента доктора биологических наук Кармаковой Татьяны Анатольевны 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 исследования**

За последние два десятилетия мы стали свидетелями появления целого спектра принципиально новых терапевтических подходов в лечении больных злокачественными новообразованиями, основанных на открытиях в области иммуноонкологии. Главные достижения противоопухолевой иммунотерапии, прочно вошедшие в клиническую практику – антитела, нацеленные на контрольные точки иммунитета (анти-CTLA-4, анти-PD-L1, анти-PD1), терапия Т-клетками с химерным антигенным рецептором (CAR-T), вакцинация модифицированными дендритными клетками. Все это стало возможным благодаря многолетним, комплексным и глубоким исследованиям механизмов противоопухолевого иммунитета, появлению концепции иммуноредактирования опухоли, пониманию сложнейших молекулярных механизмов формирования иммунного ответа. Эти достижения воодушевили исследователей на поиск эффективных средств прямого и косвенного воздействия на опухолевые клетки в самых разных направлениях, с использованием инструментов как приобретенного, так и врожденного иммунитета.

Пластичность иммунных клеток – способность Т-клеток, макрофагов и нейтрофилов изменять свой фенотип и функцию в ответ на сигналы окружающей среды, особенно в очагах воспаления, является, наверное, самой сложной проблемой, которую необходимо решать в ходе создания способов целенаправленного влияния на иммунную систему. Возникший в эволюции экономный и элегантный механизм динамичной регуляции воспалительных и иммунных реакций, позволяющий своевременно реагировать на меняющиеся условия и обеспечивающий надежность гомеостаза, узурпируется злокачественными клетками, которые используют его для своего выживания и распространения.

Разработка воздействий, способных непосредственно в микроокружении опухоли переключать функциональное состояние иммунных клеток – с противовоспалительного (проопухолевого) на провоспалительное (противоопухолевое), стало очень привлекательной концепцией развития иммунотерапии в онкологии.

Работа Е.И. Ушаковой посвящена именно такому подходу – преодолению иммуносупрессии опухолевого микроокружения и усилению противоопухолевого иммунного ответа путем стимуляции механизмов врожденного иммунитета воздействием на паттерн-распознающие рецепторы. Использование для этих целей агонистов Толл-подобных рецепторов (TLR) сегодня очень насыщенная идеями и вариантами область исследования. Показано, что активация TLR-рецепторов стимулирует врожденный иммунный ответ, запуская функциональную активацию дендритных клеток и макрофагов, что, в свою очередь, приводит к продукции цитокинов и нейропептидов, критически важных для формирования мощного противоопухолевого иммунного ответа.

В этом контексте диссертационное исследование Е.И. Ушаковой является своевременным и научно-обоснованным, а выбранное направление — актуальным.

### **Соответствие темы диссертации паспорту научной специальности**

Тема диссертации полностью соответствует паспорту научной специальности «3.2.7. Иммунология»: направления исследований: №2; №3; №6.

### **Основные результаты диссертационной работы**

В рамках проведенного исследования представлены результаты комплексного экспериментального исследования, направленного на изучение эффективности и механизмов противоопухолевого действия двух субстанций – агонистов TLR (TLR3 – PolyI:C, TLR4 – Иммуномакс) на модели перевивной карциномы молочной железы 4T1 у мышей .

Автором отработана модель карциномы 4T1 в ее классическом варианте и модель метастатической формы после хирургического удаления первичного очага. Показана противоопухолевая эффективность внутрибрюшинного введения мышам агонистов TLR3 и TLR4 после удаления первичной опухоли как по параметрам роста метастатических очагов, так и в отношении продолжительности жизни животных. Причем комбинация субстанций оказывает заметно более сильный эффект, чем

каждая из них в отдельности. Показано, что введение агонистов TLR3 и TLR4 сопровождается существенными изменениями в популяционном составе иммунных клеток в ткани опухоли, ткани легких, пораженных метастазами, и регионарных лимфатических узлах. Доказаны фенотипические изменения макрофагов и дендритных клеток, индуцированные этим воздействием, и перепрограммирование их функциональной активности, что подтверждается и изменением экспрессии соответствующих генов. Получены доказательства потенцирующего влияния данного воздействия на цитотоксическую активность Т-клеток, образование специфических антител к антигенам опухолевых клеток и формирование пула клеток памяти.

Таким образом, на основании проведенного экспериментального исследования автором сформирована доказательная база для понимания фундаментальных механизмов противоопухолевого действия агонистов TLR, которая подтверждает перспективность изучения возможности их клинического применения.

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

Выводы, сформулированные в диссертации, и положения, выносимые на защиту, четко сформулированы, обоснованы, непосредственно следуют из результатов выполненных автором экспериментальных исследований.

#### **Достоверность полученных результатов**

Диссертационная работа Е.И. Ушаковой выполнена на высоком научно-методическом уровне. Цель и задачи четко сформулированы. В работе использованы современные методы исследования, выполненные на сертифицированном оборудовании, полностью соответствуют цели и поставленным задачам. Полученные данные обработаны с применением адекватных статистических методов и достоверны.

#### **Научная новизна диссертационной работы**

В диссертационной работе получены новые научные результаты, углубляющие представления о механизмах реализации противоопухолевого иммунного ответа при метастатическом процессе в условиях экспериментальной иммунотерапии путем перепрограммирования миелоидных клеток агонистами TLR.

Впервые выполнено комплексное исследование врождённых и адаптивных иммунных реакций при сочетании хирургического удаления первичной опухоли и последующего введения агонистов TLR3 и TLR4, показавшее системный характер возникающего противоопухолевого ответа и формирование пула Т- и В-клеток памяти.

Установлено, что под действием агонистов TLR3 и TLR4 происходит функциональная перестройка макрофагов и дендритных клеток с формированием у них выраженных цитотоксических свойств, направленных против опухолевых клеток карциномы 4Т1.

Полученные данные расширяют представления о роли перепрограммированных миелоидных клеток в координации клеточного и гуморального звеньев противоопухолевого иммунитета и создают предпосылки для разработки новых стратегий иммунотерапии злокачественных новообразований.

### **Теоретическая значимость диссертационной работы**

Теоретическая значимость диссертационной работы заключается в расширении представлений о механизмах иммунологического контроля опухолевого роста при воздействии агонистов TLR3 и TLR4 на миелоидные клетки.

В ходе исследования получены новые данные о влиянии активации TLR-сигнальных путей на формирование противоопухолевого иммунного ответа, включающего как клеточные, так и гуморальные компоненты. Показано, что стимуляция Толл-подобных рецепторов способствует развитию антиген-специфических Т-клеточных реакций и синтезу IgG-антител, направленных против опухолевых антигенов.

Установлено, что под действием агонистов TLR тканевые макрофаги и дендритные клетки приобретают свойства эффекторных клеток с выраженной цитотоксической активностью, что дает им возможность участвовать в ограничении метастатического процесса. Показано, что при рецидиве опухоли миелоидные клетки сохраняют противоопухолевую активность, что сопровождается повышенной экспрессией генов *Nos2*, *Il1b* и *Tnf*.

Заслуживает отдельного внимания то, что перепрограммирование макрофагов и дендритных клеток с использованием агонистов TLR3 и TLR4 приводит к развитию устойчивой Т- и В-клеточной памяти без прямой стимуляции лимфоцитов.

Таким образом, полученные результаты углубляют современные представления о роли миелоидных клеток в регуляции противоопухолевого иммунитета и расширяют теоретические основы разработки иммунологических подходов к контролю опухолевого процесса.

### **Практическая значимость диссертационной работы**

Результаты диссертационной работы Е.И. Ушаковой имеют фундаментально-практическую направленность и являются прямыми предпосылками для разработки нового иммунотерапевтического подхода к лечению метастатических злокачественных новообразований.

В работе экспериментально продемонстрирована эффективность применения агонистов TLR3 и TLR4 в условиях метастатического процесса. Показано, что их использование сопровождается существенным снижением метастатического поражения лёгких, вплоть до полного устранения очагов, а также увеличением выживаемости животных, что свидетельствует о высоком терапевтическом потенциале предложенного подхода.

Практически значимым является установленный механизм действия, связанный с функциональной перестройкой клеток врождённого иммунитета. Показано, что под влиянием агонистов TLR макрофаги и дендритные клетки приобретают устойчивые противоопухолевые свойства и сохраняют способность реализовывать цитотоксические эффекты в условиях опухолевого микроокружения. Это имеет принципиальное значение для разработки стратегий, направленных на преодоление иммунной резистентности опухолей.

Полученные данные свидетельствуют о формировании системного противоопухолевого ответа, включающего активацию клеточного и гуморального иммунитета, а также развитие длительного иммунологического контроля над опухолевым процессом. Установлено, что индуцируемая терапией иммунная память может рассматриваться как один из ключевых факторов профилактики рецидива заболевания.

Практическую ценность представляют результаты, позволяющие рассматривать иммунологические показатели — включая характеристики Т-клеток памяти, продукцию цитокинов и наличие антиген-специфических антител — в качестве потенциальных критериев оценки эффективности иммунотерапии.

Разработанная в работе методика количественной оценки антиген-специфических CD4<sup>+</sup> - и CD8<sup>+</sup> -Т-клеток памяти отличается высокой чувствительностью и воспроизводимостью и может быть использована как в экспериментальных исследованиях, так и при анализе клинического материала.

Отдельного внимания заслуживают данные, подтверждающие возможность применения предложенного подхода в отношении клеток человека: показано, что агонисты TLR3 и TLR4 способны индуцировать формирование цитотоксически активных макрофагов и дендритных клеток, что свидетельствует о перспективности дальнейших трансляционных исследований.

Таким образом, полученные результаты создают научно-практическую основу для разработки новых иммуномодулирующих стратегий, направленных на усиление противоопухолевого иммунитета и повышение эффективности терапии метастатических форм рака.

### **Общая характеристика диссертационной работы**

Диссертация изложена в традиционном стиле на 182 страницах. Состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов, обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений, приложения и списка литературы, включающего 179 источников, из которых 21 отечественный и 158 зарубежных. Диссертационная работа содержит 33 рисунка и 7 таблиц.

Введение убедительно обосновывает актуальность проблемы. Автором четко сформулированы цель и задачи научного исследования, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, основные положения, выносимые на защиту. Все разделы написаны ёмко и лаконично, логично подводят к цели исследования.

*Замечание.* В разделе «Степень разработанности темы исследования» автор описывает работы своих коллег по Институту иммунологии. Однако здесь принято давать краткий обзор более широкого круга сведений по изучаемому направлению. Приводить критический анализ накопленных знаний, указывать достижения и пробелы. Принимая во внимание живой интерес с этой проблематике за рубежом, недостатка подобных сведений, очевидно, нет.

В главе «Обзор литературы» изложены основные положения современной концепции противоопухолевого иммунного надзора, описаны

механизмы опухоль-индуцированной иммуносупрессии, дано понятие пластичности клеток опухолевого микроокружения, обозначены перспективные направления разработки подходов к стимуляции противоопухолевой активности клеток врожденного иммунитета.

Обзор написан грамотно, последовательно. Отличается полнотой и логикой изложения. Демонстрирует владением материалом и современными источниками информации. Обзор в полной мере вводит в проблематику работы и логично подводит к непосредственному содержанию последующих глав.

В главе «Материалы и методы» представлен дизайн всех экспериментальных моделей (получение, мониторинг, оценка результатов воздействия), использованные клеточные линии и детально описаны методы исследования (хирургическая резекция, получение суспензии клеток из органов мышей, проточная цитометрия и сортировка, ELISpot, ПЦР в реальном времени, иммуноферментный анализ). Содержит полный перечень использованных методов статистического анализа. Раздел демонстрирует впечатляющий уровень профессиональной подготовки автора и владение широким арсеналом экспериментальных методов.

Глава «Результаты» содержит основной фактический материал. Результаты изложены последовательно, логично и обстоятельно, в соответствии с поставленными задачами.

Модель воздействия на опухоль после ее хирургического удаления – соответствует реальной клинической тактике лечения, когда на первом этапе проводят радикальное или условно радикальное хирургическое удаление опухолевой массы, а затем дополняют лечение loco-регионарным или системным воздействием.

Каждый подраздел автор начинает коротким вступлением, подводящим к необходимости решать поставленную задачу, и заканчивает кратким и объективным заключением-выводом из полученного результата. Это помогает удержать общую логику исследования, подчеркивает преемственность задач и дает обоснование каждому следующему шагу.

Раздел, как и вся диссертационная работа, прекрасно иллюстрирован, содержит информативные диаграммы и таблицы.

Самым тщательным образом охарактеризованы параметры метастатической модели, динамика развития метастазов, клеточный состав тканей. Подчеркнем адекватный выбор модели: с одной стороны, она вполне воспроизводит клиническую ситуацию, часто встречающуюся у

пациентов; с другой стороны, она создает условия для реализации потенциального действия противоопухолевого иммунного ответа, которое с большей вероятностью проявит себя в отношении диссеминированных опухолевых клеток, чем в отношении солидного образования.

Отдельно следует отметить, что объем и качество выполненной работы, уровень подачи материала и абсолютная завершенность исследовательской линии производят впечатление. Автор не оставил без внимания ни один из вопросов, который мог бы поднять въедливый оппонент в поисках «белых пятен». Автором изучены события на уровне местных и системных реакций, в опухоли и в органах, пораженных метастазами, со стороны врожденного и приобретенного звеньев иммунитета, клеточных и гуморальных реакций. Нужно сказать, что такой подход как нельзя лучше соответствует сложным интегральным иммунным процессам. При этом автор сохраняет достойный уровень объективности и неоднократно напоминает о том, что определенные изменения регистрируются не у всех животных в экспериментальной группе, что также прекрасным образом согласуется с известной вариативностью индивидуальных иммунных реакций, осложняющей применение иммуноотропных средств.

*Вопросы.*

- 1) В качестве контроля животным вводили физраствор, что является контролем к манипуляциям, но не к воздействию вещества. Более адекватной альтернативой, в идеале, могла бы быть субстанция, сходная по молекулярной массе, химической структуре, но заведомо не обладающая биологической активностью.
- 2) Чем руководствовались при выборе доз исследуемых субстанций и режимов введения?

В главе «Обсуждение результатов» автор приводит глубокий и критический анализ полученных результатов, сопоставляя их с данными литературы. Убедительно показаны преимущества разработанного экспериментального подхода. Особый интерес представляет обсуждение взаимосвязей миелоидных клеток с активацией механизмов противоопухолевой иммунной защиты.

*Вопрос.*

Необходимо отметить, что за последние годы в мире инициировано множество клинических испытаний средств, которые являются полными или частичными аналогами субстанций, исследованных в настоящей

работе. В том числе, в сочетании с другими видами противоопухолевой иммунотерапии – вакцинами, ингибиторами контрольных точек иммунитета. В обсуждении результатов, к сожалению, автор этот аспект не затрагивает, в связи с чем возникает ряд вопросов:

- знаком ли автор с результатами этих клинических испытаний, и какую оценку можно им дать?

- что отличает субстанции, которые стали объектом исследования автора, от упомянутых аналогов? Есть ли особые преимущества их применения?

- какие перспективы у исследованных автором субстанций выйти на клинические испытания в онкологической клинике в нашей стране?

Все указанные выше замечания не снижают ценность полученных результатов и не являются критическими.

Заключение и выводы полностью соответствуют цели и задачам исследования, логично вытекают из полученных результатов и являются обоснованными.

Основные результаты диссертационной работы опубликованы в 15 печатных работах, в том числе 7 статьях в рецензируемых научных журналах, рекомендованных для публикации основных научных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата, 8 публикаций в материалах конгрессов и конференций. Материалы работы неоднократно докладывались и обсуждались на всероссийских и международных научных конференциях.

Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

### **Заключение**

Диссертационная работа Ушаковой Екатерины Игоревны «Экспериментальная иммунотерапия злокачественного новообразования путем перепрограммирования миелоидных клеток в модели метастатической карциномы у лабораторных мышей» является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальных задач, имеющих значение для иммунологии: получены новые данные, характеризующие процесс функционального перепрограммирования тканевых макрофагов и дендритных клеток, в результате которой они приобретают выраженные цитотоксические свойства в отношении метастатических клеток карциномы 4T1; изучены особенности

формирования долговременной иммунной памяти, направленной против опухолевых антигенов 4T1, в условиях рецидива злокачественного процесса; обоснована эффективность применения агонистов TLR для перепрограммирования миелоидных клеток после удаления опухоли, что сопровождается увеличением выживаемости животных до 50%.

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».

Официальный оппонент:  
доктор биологических наук,  
ведущий научный сотрудник  
отделения прогноза эффективности  
консервативного лечения  
МНИОИ им. П.А. Герцена –  
филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии»  
Минздрава России

«24» 09 2026 г.

Кармакова Татьяна Анатольевна

Подпись д.б.н. Т.А. Кармаковой заверяю:  
Ученый секретарь  
ФГБУ «НМИЦ радиологии»  
Минздрава России  
кандидат биологических наук



Жарова Елена Петровна

Контактная информация: федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России), 125284, Российская Федерация, г. Москва, 2-й Боткинский проезд, дом 3, тел. +7(495) 150-11-22, e-mail: [contact@nmicr.ru](mailto:contact@nmicr.ru), сайт: [www.mnioi.nmicr.ru](http://www.mnioi.nmicr.ru)