

20 АПР 2021

№ -138-

УТВЕРЖДАЮ

И.о. директора

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт  
биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича»

доктор биологических наук

Пономаренко Е.А.

«20» апреля 2021 г.

**Отзыв ведущей организации**

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» на диссертацию Балдина Алексея Викторовича «Раково-сетчаточные антигены в контексте диагностических и иммунотерапевтических подходов в онкологии», представленную к публикации и защите в диссертационном совете ДСУ 208.003.01 при ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет) по адресу: г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2, на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности

03.01.03 – «Молекулярная биология»

**Актуальность темы исследования**

Заболеваемость и смертность онкологическими заболеваниями в России и мире неуклонно растет, что является большим вызовом современной науке и медицине. Огромное количество научных коллективов работают над разработкой и трансляцией в клиническую практику новых методов диагностики и лечения онкологических заболеваний. С этой точки зрения, поиск новых типов опухолеспецифичных антигенов, стабильно экспрессирующихся в различных опухолях, но не нормальных тканях, является весьма актуальным направлением научных исследований онкологии

и молекулярной биологии. Развитие данного направления необходимо для диагностики и иммунотерапии онкологических заболеваний

### **Связь работы с планом соответствующих отраслей науки**

Диссертационная работа Балдина Алексея Викторовича выполнена в соответствии со стратегией развития научных исследований ФГАОУ ВО «Первый МГМУ имени И.М. Сеченова», а также в соответствии со Стратегией развития медицинской науки в Российской Федерации на период до 2025 года, утвержденной 28 декабря 2012 г., по научной платформе «онкология». Тема диссертационной работы соответствует комплексной теме Института молекулярной медицины ФГАОУ ВО «Первый МГМУ имени И.М. Сеченова» «Выявление новых раково-сетчаточных антигенов, аберрантно экспрессирующихся в клетках опухолей почки и надпочечника» № АААА-А16-116121550003-3.

### **Структура, оформление и содержание диссертации**

Работа выполнена в соответствии с требованиями ГОСТ Р 7.0.11-2011, структурирована в традиционном для научных трудов стиле, включая в себя оглавление, введение, обзор литературы по теме, материалы и методы, использованные в работе, полученные результаты и их обсуждение. В конце работы кратко даны выводы, следующие из полученных результатов. Список использованной при написании диссертации литературы состоит из 308 источников, все из которых являются зарубежными. Диссертационная работа изложена на 118 страницах, сопровождается 14 таблицами и 25 рисунками.

**Во введении** автор аргументирует актуальность выбранной им темы работы, формулирует основные цели и задачи исследования, положения, выдвигаемые на защиту, отмечает новизну и практическую значимость полученных результатов.

**В обзоре литературы** автор всесторонне, с привлечением большого числа литературных источников, рассматривает существующие иммунотерапевтические подходы в онкологии, механизмы вовлеченности различных типов лимфоцитов, дендритных клеток и опухолевого окружения в развитие противоопухолевого иммунитета. Подробно рассмотрены различные типы противоопухолевых вакцин. Обсуждена роль белков теплового шока в формировании противоопухолевого

иммунитета. Подчеркивается, что одной из наиболее представляющих интерес стратегий таргетинга дендритных клеток и мусорных рецепторов, является использование белков теплового шока в качестве молекул-доставщиков иммуногенных опухолевых пептидов или белков. В завершении обзора литературы автор рассматривает различные аспекты персонализированной медицины и диагностические подходы в онкологии.

Знакомство с обзором литературы Балдина Алексея Викторовича свидетельствует о прекрасном владении автором обширным и многоплановым экспериментальным материалом по теме диссертации и большом количестве привлеченных литературных источников, многие из которых опубликованы в последние годы. Хорошему усвоению литературного материала способствуют удачно подобранный информативный иллюстрационный материал.

**В главе «Материалы и методы»** приведены использованные в работе разнообразные современные биохимические, молекулярно-генетические, иммунологические и статистические методы, методы клеточной биологии, адекватно подходящие к решению поставленных автором задач, что позволяет оценить методический уровень диссертации как высокий. К числу таких методов относятся: анализ экспрессии генов, методика анализа сыворотки крови пациентов на наличие аутоантител, бисульфитное секвенирование ДНК, конструирование плазмидных конструкций, кодирующих фьюжн-белки, культивирование иммунных клеток периферической крови, индукция дифференцировки моноцитов в дендритные клетки, инкубация дендритных клеток со слитым белком и индукция активации и созревания, метод проточной цитометрии, методы статистического анализа и др. Раздел написан основательно и подробно. Описанные методики позволяют воспроизвести их.

**Главу «Результаты работы»** можно условно разделить на три части: первая часть является скрининговым исследованием с целью выяснения возможности экспрессии раково-сетчаточного антигена аррестина-1 в опухолях и продукцию к нему антител при почечно-клеточной карциноме. Вторая часть посвящена конструированию гибридного белка, аминокислотная последовательность которого представляет собой белок теплового шока A1B (HSP70) с присоединенными к нему с

N- и C-концов эпитопами рековерина. В третьей части работы представлены результаты анализа иммуногенности полученного слитого белка с целью выяснить потенциал его использования в качестве вакцины.

В главе «**Обсуждение результатов**» автор достаточно подробно обсуждает значимость полученных результатов и сопоставляет их с результатами других исследований. Проведенное диссертантом обсуждение результатов логично и интересно. Балдин Алексей Викторович продемонстрировал умение использовать литературные данные для ведения научной дискуссии и обоснования своей интерпретации экспериментальных результатов.

### **Научная новизна исследования и результатов, полученных и сформулированных в диссертации**

В настоящей работе впервые была продемонстрирована возможность aberrантной экспрессии раково-сетчаточного антигена аррестина-1 в почечно-клеточной карциноме на протеомном уровне. Помимо этого, было показано, что у пациентов с почечно-клеточной карциномой довольно часто обнаруживаются антитела к аррестину-1. Было сформулировано предположение, что обнаруженная продукция антител к аррестину-1 может быть использована для раннего выявления злокачественного процесса в почках. Предположение об использовании антител в качестве маркеров злокачественного процесса интересно как самостоятельное направление. К настоящему моменту в качестве биомаркеров онкологических заболеваний используются белки и нуклеиновые кислоты, производимыми опухолевыми клетками, в то время как антитела производятся иммунными клетками в ответ на экспрессию опухолевых белков.

В данной работе впервые был использован белок рековерин из группы раково-сетчаточных антигенов в качестве компонента предполагаемой противоопухолевой вакцины. До настоящего времени, в качестве иммуногена для противоопухолевых вакцин использовались лишь антигены из группы раково-зародышевых (тестикулярных) или меланома-ассоциированных антигенов. В последнее время появляются работы, где описывается использование для целей создания противоопухолевых вакцин некоторых неоантигенов. Литературных данных об

использовании раково-сетчаточных антигенов в качестве противоопухолевых вакцин нет, что обуславливает новизну обсуждаемой работе. Гибридные белки на основе белка теплового шока до настоящего момента конструировались таким образом, что в своем составе несли только некие модельные белки для проверки возможности использования таких конструкций в целом (например, белок OVA - овальбумин). В настоящей работе предложена оригинальная идея фьюжн-белков, в которой белок теплового шока HSP70 находится в связи с двумя эпитопами антигена, специфичными человеческим лейкоцитарным антигенам. Предполагается, что данная конструкция способна доставлять опухолевый антиген (рековерин, в данном случае) в лимфоциты человека, активируя тем самым противоопухолевый иммунитет.

### **Значимость полученных результатов для науки и практики**

Полученные в настоящей работе экспериментальные данные и сделанные на их основе выводы представляют интерес и являются важными для понимания функционирования раково-сетчаточных антигенов. Вывод о возможности использования аутоантител к аррестину-1 в качестве маркера злокачественного процесса в диссертации подкреплён наличием патента, описывающего методику детекции антител к аррестину-1 и ее использование в качестве диагностического подхода, автором которого в т.ч. является Балдин А.В. Полученные же в ходе работы гибридные конструкции предполагаемых белков-вакцин, а также полученные данные об их способности активировать дендритные клетки являются предпосылками развития иммунотерапевтического направления и для трансляции таких вакцин в клиническую практику.

Помимо указанного прикладного значения, полученные результаты побуждают к продолжению исследований и выяснению возможной роли раково-сетчаточных белков в злокачественных клетках.

### **Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и заключений**

Работа выполнена на высоком теоретическом и экспериментальном уровне с использованием современного оборудования. Методы исследования соответствуют поставленным целям. Экспериментальные схемы включают достаточное количество

технических повторений и адекватное количество контрольных измерений. Система оценки полученных результатов и критерии анализа подобраны специально для решения задач, поставленных в работе. Результаты работы согласуются с данными других исследователей. Полученные результаты исследования сопровождаются статистическим анализом. Результаты работы были представлены на четырех международных конференциях, а также апробированы на заседании Института молекулярной медицины ФГАОУ ВО «Первый МГМУ имени И.М. Сеченова».

### **Рекомендации по практическому использованию и внедрению результатов и выводов диссертационной работы**

В ходе диссертационной работы было обнаружено, что у пациентов с почечно-клеточной карциномой экспрессируется аррестин-1, а также продуцируются к нему аутоантитела. Сделан вывод о возможном использовании таких антител в качестве маркера для диагностики почечно-клеточной карциномы. Учитывая, что по результатам данной работы был получен патент, описывающий методику определения антител к аррестину-1 в сыворотке крови пациентов, такая технология могла бы быть в кратчайшие сроки транслирована в клиническую практику, предварительно пройдя дополнительные исследования по валидации метода. Разработанный тест возможно использовать в клинической практике онкологических стационаров, как в скрининговых и диагностических целях, так и с целью выявить наличие антител к аррестину-1 у пациентов с уже диагностированной почечно-клеточной карциномой. Наличие аутоантител свидетельствует о синтезе аррестина-1 опухолью, что является основанием его дальнейшего использования в качестве компонента противоопухолевой вакцины.

Результаты, показывающие эффективную активацию полученными фьюжн-белками дендритных клеток, являются предварительными. Для трансляции данной технологии в клиническую практику, потребуется проведение дополнительной экспериментальной работы *in vitro*, а также исследования их эффективности на животных моделях. Учитывая использование высоко иммуногенного белка рековерина из группы раково-сетчаточных белков, такой иммунотерапевтический подход выглядит эффективным.

### Замечания по диссертации

По содержанию диссертационной работы имеется ряд замечаний.

Замечания по существу работы.

1. В работе не обоснована замена рековерина на аррестин в экспериментах. Не ясно, почему в первой части работы для скрининговых исследований мишенью был выбран раково-сетчаточный антиген аррестин-1, тогда как для второй части работы по конструированию и исследованию гибридного белка-вакцины был выбран раково-сетчаточный антиген рековерин?

2. Исходя из статистического анализа, данные о корреляции экспрессии аррестина-1 в почечно-клеточной карциноме со снижением пятилетней выживаемости нельзя интерпретировать однозначно. Однако, автором сделаны соответствующие оговорки на этот счет. В целом, статистическая обработка данных сделана на должном уровне и позволяет говорить об их достоверности.

3. При описании метода бисульфитной конверсии отсутствует описание этапа десульфонирования. Это ключевая часть метода, т.к. после бисульфитной и термической обработки образуется не урацил, а урацил-сульфонат, который в большинстве случаев ингибирует полимеразную активность при выполнении ПЦР. Десульфонирование нацелено на преобразование интактного урацил-сульфоната в урацил, который, в свою очередь, будет распознаваться ДНК-полимеразой.

4. В пункте 8.1.6. автор часто употребляет следующее словосочетание: «Трансфекция плазмидных конструкций в *E.coli*». Между тем, при переносе плазмидной ДНК в клетки *E.coli* правильнее говорить не о трансфекции, а о трансформации клеток бактерии некой плазмидной конструкцией.

5. По ходу текста, у автора встречается словосочетание термофильная ДНК-полимераза. Однако это наименование не верное. Термофильным может быть микроорганизм, а белок-полимераза может быть только термостабильным.

6. Автором для экспрессии весьма сложных химерных белков, был выбран не очень надёжный штамм *E.coli* JM109. Данный штамм, по причине нуклеозодефицитности, хорошо подходит для рутинного клонирования плазмид и некоторых одноцепочечных фагов, однако в качестве штамма для экспрессии белков

его выбирают достаточно редко, т.к. данные клетки не относятся к категории протеазодефицитных. Если бы в качестве экспрессионных были бы выбраны более профильные штаммы, уровень экспрессии и "растворимости" мог бы быть ещё выше.

Замечания по оформлению работы

7. Бросается в глаза обилие стилистических и пунктуационных ошибок, как в теле диссертации, так и в автореферате.

8. Присутствует двуязычное обозначение некоторых реактивов. Например, Трис и Tris.

9. Отсутствует нумерация глав диссертации, что затрудняет работу с рукописью. Например, раздел 2 есть как в обзоре литературы, так и в материалах и методах и в результатах.

10. Слова на латинском языке *in vitro* и *in vivo* следует писать курсивом.

11. В обсуждении результатов работы хочется видеть визуализацию предложенной концепции модуляции противоопухолевого иммунитета на основе разработанной схемы фьюжн-белков. Суммирующий наглядный рисунок стал бы украшением работы.

Следует заметить, что указанные замечания носят не принципиальный характер и не меняют общей положительной оценки работы и ее значимости для молекулярной биологии и онкологии

**Подтверждение опубликованных основных результатов диссертации в научной печати**

Содержание диссертационной работы представлено в трех научных статьях, опубликованных в международных рецензируемых научных журналах с достаточно высоким рейтингом (IF 3.4, 4.1, 6.1), все три входят в первый квартиль и цитируются в базах данных Scopus и Web of Science. Балдин А.В. является первым автором во всех публикациях.

**Заключение**

Таким образом, диссертационная работа Балдина Алексея Викторовича «Раково-сетчаточные антигены в контексте диагностических и иммунотерапевтических подходов в онкологии» является полноценной оригинальной научно-



квалификационной работой, в которой предлагается новый способ ранней диагностики злокачественных новообразований почек. Также, в рамках работы была разработана и сконструирована противоопухолевая вакцина на основе белка из ранее не использованной для этого группы раково-сетчаточных антигенов.

По актуальности поднятой проблемы, примененному комплексу методов, объему материала, научной и практической значимости, новизне и достоверности результатов представленная диссертационная работа соответствует требованиям п.16 «Положения о присуждении ученых степеней Университета», утвержденного приказом ректора ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет) от 31.01.2020 года № 0094/Р, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор, Балдин Алексей Викторович, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – «Молекулярная биология».

Отзыв обсужден и одобрен на заседании межлабораторного семинара ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» 20 апреля 2021 г.

Протокол № 2 от «20» апреля 2021 г.

Отзыв составил:

Ведущий научный сотрудник,

заведующий лабораторией медицинской биотехнологии

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича»

доктор биологических наук (по специальности 03.01.04 – «Биохимия»),

Жданов Дмитрий Дмитриевич

