

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

**доктора медицинских наук Повещенко Ольги Владимировны на
диссертационную работу Хантаковой Юлии Николаевны**

на тему: «Влияние дендритных клеток, трансфицированных полиэпитопными ДНК-конструкциями, на индукцию цитотоксического ответа культуры моноклеарных клеток больных раком молочной железы», представленную на соискание учёной степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.09 – «Клиническая иммунология, аллергология»

Актуальность темы исследования

Работа Ю. Н. Хантаковой посвящена решению важной для клинической иммунологии и онкоиммунологии научно-практической задачи – разработке дендритно-клеточных вакцин для индукции противоопухолевого иммунного ответа. Актуальность исследования не вызывает сомнения и обусловлена тем, что рак является одной из главных причин заболеваемости и смертности, а значительное число пациентов не отвечают на традиционные методы лечения. Исследованиями последних лет показано, что при раке молочной железы (РМЖ) не происходит формирования протективного противоопухолевого иммунного ответа, что в какой-то мере связано с нарушением функционирования иммунокомпетентных клеток. На сегодняшний день наиболее перспективным из разрабатываемых подходов в лечении онкологических заболеваний является индукция антигенспецифического иммунного ответа с помощью антигенпрезентирующих клеток. Дендритные клетки (ДК) являются профессиональными антигенпрезентирующими клетками, обладающими цитотоксической активностью, что позволяет рассматривать их в качестве привлекательных кандидатов для иммунотерапии опухолевых заболеваний. Новым подходом в иммунотерапии является вакцилотерапия на основе ДК. Известные стратегии создания таких вакцин основаны на использовании различных форм опухолевых антигенов, лизатов клеток, полиэпитопных

антигенов, содержащих по несколько Т-клеточных эпитопов, индуцирующих ответ цитотоксических и/или хелперных Т-лимфоцитов. Как правило, в настоящее время иммунотерапевтические клеточные вакцины представляют собой индивидуализированные препараты, приготавливаемые на основе лизата аутологичных опухолевых клеток. Но такой подход чреват развитием в дальнейшем у пациента аутоиммунных реакций, тк эти препараты помимо опухолевых антигенов содержат большое количество белков, присутствующих в нормальных тканях организма. При этом сложно добиться высокого уровня активации цитотоксических Т-лимфоцитов, поскольку презентация антигенов осуществляется по МНС-II-зависимому механизму с использованием незрелых ДК, которые ниже индуцируют цитотоксический ответ, что определяет необходимость дальнейших исследований.

В связи с этим, одним из перспективных подходов получения функционально-активных ДК для активации противоопухолевого иммунного ответа является использование в качестве источника антигенов ДНК-конструкций, кодирующих генетические последовательности опухолевых антигенов и/или их отдельных иммуногенных эпитопов, что позволяет стандартизировать процесс получения вакцины.

Диссертационная работа Ю.Н.Хантаковой как раз и посвящена этому актуальному направлению, в частности, исследованию эффективности индукции клеточного цитотоксического иммунного ответа в культуре моноклеарных клеток (МНК) периферической крови больных раком молочной железы с помощью зрелых дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкциями, кодирующими иммуногенные эпитопы опухоль-ассоциированных антигенов.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций

Достоверность результатов работы, научные положения и выводы диссертации основаны на достаточном для решения поставленных задач объеме материала. Диссертация Хантаковой Ю.Н. написана в классическом стиле, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и

методов исследования, результатов собственных исследований, обсуждения полученных результатов, заключения, выводов, списка литературы и приложения. Работа изложена на 120 страницах печатного текста, иллюстрирована 15 рисунками и 1 таблицей.

Введение отвечает предъявляемым требованиям, содержит все необходимые разделы: кратко обоснована актуальность, сформулированы цель и задачи исследования, представлены положения, выносимые на защиту, отражена новизна, теоретическая и практическая значимость диссертационной работы.

В первой главе традиционно представлен обзор литературы, в котором рассмотрены механизмы противоопухолевого иммунного ответа и их нарушения. Рассматривается роль ДК и Т - лимфоцитов в противоопухолевом иммунитете и состояние клеток адаптивного иммунного ответа в процессе опухолевой инвазии. Дана подробная характеристика основных опухоль-ассоциированных антигенов при раке молочной железы, описаны способы доставки опухолевых антигенов иммунокомпетентным клеткам для модуляции иммунного ответа, преимущества и недостатки различных источников опухолевых антигенов для праймирования ДК. Анализированы преимущества ДНК - конструкций с наиболее иммуногенными эпитопами, обосновывается трансфекция ДНК-конструкциями ДК. Список литературы содержит 194 литературных источника, из них 177 зарубежных. Достаточное количество проанализированных литературных источников демонстрирует широкий кругозор автора в исследуемой теме. Знание литературы позволило автору сформулировать цель и задачи собственного диссертационного исследования.

Раздел «Материалы и методы» посвящен характеристике объекта и описанию методов исследования. Дизайн работы четкий, приводится схема получения антиген-активированных ДК. Из данного раздела следует, что в работе использован достаточный по объёму материал, применены

современные иммунологические методы, адекватная статистическая обработка материала.

Глава «Результаты собственных исследований» состоит из 6-ти разделов в соответствии с поставленными задачами.

Первые два посвящены оценке эффективности протокола получения зрелых ДК и влияния ДК, трансфицированных двумя ДНК конструкциями, на цитотоксический потенциал культуры МНК условно-здоровых доноров. Автор исследует функциональную активность ДК, трансфицированных 2 опытными плазмидами. В результате проведенной работы автор убедительно доказал эффективность индукции специфического цитотоксического иммунного ответа в культуре МНК с помощью одной из исследованных трансфицированных ДК конструкций, кодирующей поли-ЦТЛ-эпитопный иммуноген, содержащий HLA-A*02:01-специфичные антигенные детерминанты белка HER2/neu (увеличение количества клеток, несущих перфориновые гранулы, цитотоксический ответ в отношении клеточной опухолевой линии MCF-7).

После определения наиболее активной ДНК-конструкции автор выстраивает дизайн исследования и в последующих 3 и 4 разделах представляет оценку протокола получения зрелых ДК и влияния ДК, трансфицированных эффективными ДНК-конструкциями, содержащими специфичные антигенные детерминанты опухоль-ассоциированных антигенов, на цитотоксический потенциал МНК больных раком молочной железы (РМЖ). Показана не только стимуляция цитотоксической активности МНК полученными трансфицированными ДК против аутологических опухолевых клеток, но и подход дополнительной стимуляции цитотоксической активности с помощью иммунорегуляторных цитокинов ИЛ-12 и ИЛ-18. Ю.Н. Хантакова не ограничивается исследованием цитотоксичности, но и определяет один из возможных механизмов цитотоксической активности в культуре, связанный с увеличением перфорин-позитивных клеток.

Далее автор аргументированно обосновывает разделение больных РМЖ в зависимости от гаплотипа HLA-A*02 и оценивает эффективность трансфицированных полиэпитопной HLA-A*02:01-специфичной ДНК-конструкций ДК модулировать цитотоксический ответ в подгруппах, чему посвящен 5 раздел результатов. Автором показана эффективная стимуляция цитотоксического потенциала культуры МНК при использовании ДК, трансфицированных ДНК-конструкциями, кодирующими поли-ЦТЛ-эпитопные иммуногены, содержащие HLA-A*0201-специфичные антигенные детерминанты ОАА, как у HLA-A*02-позитивных, так и у HLA-A*02-негативных больных раком молочной железы при добавлении иммунорегуляторных цитокинов ИЛ-12 и ИЛ-18.

В последнем разделе автор проводит сравнение влияния двух источников опухолевых антигенов - лизата аутологичных опухолевых клеток и ДНК-конструкций для праймирования ДК с целью формирования наиболее специфического цитотоксического иммунного ответа в культуре МНК больных РМЖ против аутологичных опухолевых клеток. Показано, что только в присутствии иммунорегуляторных цитокинов ИЛ-12 и ИЛ-18 дендритные клетки, праймированные антигенами лизата опухолевых клеток, стимулируют цитотоксический ответ культуры МНК, в отличие от трансфицированных ДК.

Данные результаты позволили автору говорить об эффективности трансфицированных ДК индуцировать цитотоксическую активность культуры МНК, а также заключить, что использование ДК, трансфицированных ДНК-конструкциями, кодирующими поли-ЦТЛ-эпитопные иммуногены, содержащие HLA-A*0201-специфичные антигенные детерминанты ОАА, является эффективным способом индукции противоопухолевого ответа в культуре МНК больных РМЖ, а использование иммунорегуляторных цитокинов ИЛ-12 и ИЛ-18 способствует дополнительному повышению цитотоксического потенциала данных культур.

В главе «Обсуждение» автор анализирует полученные результаты в контексте известных данных и дает им оценку с точки зрения новизны и значимости, что еще раз подтверждает эрудицию автора. Глава «Обсуждение» является одним из достоинств работы.

Работу завершают 5 выводов, которые вытекают непосредственно из собственных результатов. Выводы сформулированы четко и отражают суть полученных результатов.

Оценка новизны полученных автором результатов

Результаты исследования Ю. Н. Хантаковой являются новыми. Продемонстрировано, что дендритные клетки, трансфицированные ДНК-конструкцией, кодирующей поли-ЦТЛ-эпитопный иммуноген, содержащий HLA-A*02:01-специфичные антигенные детерминанты белка HER2-neu, по сравнению с дендритными клетками, трансфицированными ДНК-конструкцией, кодирующей полноразмерный белок ERBB2, более эффективно индуцируют способность МНК здоровых доноров вызывать гибель опухолевых клеток линии MCF-7. Одним из возможных механизмов цитотоксичности является увеличение перфорин-позитивных клеток. Также впервые показано, что зрелые ДК, трансфицированные ДНК-конструкциями, кодирующими поли-ЦТЛ-эпитопные иммуногены, содержащие HLA-A*02:01-специфичные антигенные детерминанты нескольких опухоль-ассоциированных антигенов, индуцируют способность моноклеарных МНК вызывать гибель аутологичных опухолевых клеток при совместном культивировании, о чем свидетельствует повышение цитотоксической активности МНК больных раком молочной железы против аутологичных опухолевых клеток, а также увеличение количества перфорин-позитивных клеток в данных культурах. Впервые установлено, что дендритные клетки, трансфицированные ДНК-конструкциями, кодирующими поли-ЦТЛ-эпитопные иммуногены, содержащие HLA-A*02:01-специфичные антигенные детерминанты нескольких опухоль-ассоциированных антигенов индуцируют цитотоксический иммунный ответ в культуре МНК против

аутологичных опухолевых клеток рака молочной железы как при добавлении, так и без ИЛ-12 и ИЛ-18, в отличие от дендритных клеток, праймированных антигенами лизата аутологичных опухолевых клеток, которые индуцируют цитотоксический ответ МНК только при добавлении костимуляторных факторов ИЛ-12 и ИЛ-18.

Достоверность полученных результатов

Достоверность полученных результатов и выводов основывается на логичности и высоком методическом уровне дизайна исследования, использования высокоинформативных методов исследования, тщательном анализе полученных данных, корректной статистической обработке. Полученные материалы диссертации доложены и обсуждены на всероссийских и международных научных форумах, представлены в 15 печатных работах, в том числе 4 статьях в изданиях, рекомендованных ВАК. Приоритет исследования подтвержден патентом РФ, подана 1 заявка на патент. Результаты, представленные в данной работе, получены и проанализированы лично автором. Все выше сказанное позволяет считать, что представленные автором результаты достоверны, а выводы вполне обоснованны и соответствуют полученным данным.

Теоретическая значимость работы

Заключается в том, что использование дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкциями, кодирующими поли-ЦТЛ-эпитопные иммуногены, содержащие HLA-A*02:01-специфичные антигенные детерминанты нескольких опухоль-ассоциированных антигенов является эффективным способом стимуляции цитотоксического потенциала мононуклеарных клеток больных раком молочной железы по сравнению с использованием ДНК-конструкций, кодирующих полноразмерный белок ERBB2. Полученные данные указывают на то, что уровень стимуляции МНК дендритными клетками, трансфицированными ДНК-конструкциями, зависит от HLA-A-гаплотипа больного и от типа используемой ДНК-конструкции. Дендритные клетки, трансфицированные ДНК-конструкциями,

кодирующими поли-ЦТЛ-эпитопные иммуногены, содержащие HLA-A*02:01-специфичные антигенные детерминанты нескольких опухоль-ассоциированных антигенов, индуцируют формирование эффективного цитотоксического ответа МНК только при соответствующем гаплотипе HLA*02:01 больных раком молочной железы. Дополнительное воздействие иммунорегуляторных цитокинов ИЛ-12 и ИЛ-18 на совместные культуры дендритных клеток, трансфицированных полиэпитопными HLA-A*02:01-специфичными ДНК-конструкциями, и МНК позволяет формировать клеточно-опосредованный цитотоксический ответ культуры МНК против аутологичных опухолевых клеток также в группе HLA-A*02-негативных больных раком молочной железы.

Практическая значимость работы

В ходе выполнения Ю. Н. Хантаковой диссертационной работы был обоснован способ генерации антиген-специфических цитотоксических клеток с противоопухолевой активностью при раке молочной железы. Полученные автором данные о цитотоксическом противоопухолевом эффекте дендритных клеток, трансфицированных полиэпитопными ДНК-конструкциями, сокультивированных с МНК периферической крови, позволяют рассматривать их в качестве перспективного подхода для разработки новых методов клеточной иммунотерапии больных раком молочной железы. Отработанный протокол послужил основой получения патента на изобретение №2521506 «Способ генерации антиген-специфических цитотоксических клеток с противоопухолевой активностью при раке молочной железы» и оформления заявки №201313546 на получение патента.

В целом диссертация Ю. Н. Хантаковой производит хорошее впечатление, она современна, конкретна, обладает внутренним единством, написана заинтересованно, хорошим литературным языком. Рукопись аккуратно оформлена, хорошо иллюстрирована, встречаются единичные опечатки, но они не умаляют достоинств работы. Основные результаты

исследования опубликованы в изданиях, рекомендованных ВАК. Автореферат полностью отражает содержание работы. Принципиальных замечаний к диссертационной работе Ю. Н. Хантаковой нет.

В качестве дискуссии хотелось бы задать автору ряд вопросов.

1. Насколько была эффективна доставка вакцинной ДНК и какова жизнеспособность клеток после трансфекции?

2. Как вы думаете, при внедрении в клиническую практику будет ли эффективна терапия дендритно-клеточной вакциной пациентам с гормонозависимой опухолью молочной железы, экспрессирующей рецептор к эстрогену или предполагается ее использование только для лечения эстрогеннезависимого рака молочной железы? Вопрос возникает в связи с тем, что эстрогензависимые опухолевые клетки имеют повышенный уровень экспрессии связанного с рецептором определенного белка (EBAG9), который секретируется в интерстициальное пространство, функционирует в качестве лиганда для предполагаемого рецептора, присутствующего на ЦТЛ и НК-клетках, вызывая их апоптоз и гибель.

3. Помимо использования последовательности определенных иммуногенных эпитопов опухолевых антигенов могут ли в плазмидную ДНК добавлены конструкции, которые оказывают влияние на функциональное состояние ДК, например миграцию?

Заключение

Диссертационное исследование Ю. Н. Хантаковой «Влияние дендритных клеток, трансфицированных полиэпитопными ДНК-конструкциями, на индукцию цитотоксического ответа культуры моноклеарных клеток больных раком молочной железы», представленное на соискание учёной степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.09 – «Клиническая иммунология, аллергология», выполненное под руководством д.м.н., профессора Сенникова С.В., является законченной научной квалификационной работой, в которой содержится решение важной для

клинической иммунологии и онкоиммунологии научно-практической задачи – разработка способа индукции цитотоксического противоопухолевого иммунного ответа с помощью генерированных из периферической крови пациентов с раком молочной железы дендритных клеток, трансфецированных полиэпитопными ДНК-конструкциями.

По своей актуальности, объему выполненных исследований, новизне и научно-практической значимости диссертация Ю. Н. Хантаковой соответствует требованиям п. 9, предъявляемым к кандидатским диссертациям, установленным «Положением о порядке присуждения ученых степеней», утвержденным постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.09 – «Клиническая иммунология, аллергология»

Официальный оппонент
(03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология)
доктор медицинских наук,
Заведующая лаборатории клеточных технологий
Федерального государственного бюджетного научного
учреждения «Научно-исследовательский
институт клинической и экспериментальной
лимфологии»
630060, г. Новосибирск, ул. Тимакова, д. 2.
Тел. (383) 3336409
e-mail: poveschenkoov@yandex.ru



Повещенко Ольга Владимировна

29 марта 2016 года

Начальник научно-организационного
отдела, и.о. ученого секретаря НИИКЭЛ



Власова Наталья Васильевна