

ОТЗЫВ

официального оппонента

доктора медицинских наук Балдуевой Ирины Александровны на диссертацию Тыриновой Тамары Викторовны «Цитотоксическая активность дендритных клеток против клеток глиобластомы: медиаторы, механизмы регуляции и возможности направленной коррекции», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология

Актуальность темы диссертационного исследования

В настоящее время наблюдается устойчивая тенденция к увеличению общей заболеваемости опухолями головного мозга. Согласно данным А.Д. Каприна и соавт. (2018) у всех заболевших в возрасте до 30 лет злокачественные новообразования головного мозга и других отделов нервной системы находятся на втором месте по частоте встречаемости и составляют 10,4% от общей структуры онкологических заболеваний. Развитие и рост опухоли связаны с различными механизмами, которые позволяют ей «ускользнуть» от иммунного надзора и создают оптимальные условия для опухолевой прогрессии. В условиях опухолевого роста функциональная активность дендритных клеток (ДК) часто нарушена, что снижает эффективность противоопухолевого иммунного ответа.

Глиобластома, несмотря на возможности существующей терапии, является одной из наиболее злокачественных и агрессивных форм опухолей у человека, и выявленное нарушение эффекторной функции ДК может играть значимую патогенетическую роль в несостоятельности противоопухолевой защиты у больных этими злокачественными новообразованиями. Однако этот вопрос по-прежнему остается неизученным. В этом контексте особый интерес представляют исследования возможных способов регуляции цитотоксических свойств ДК, поскольку индукция ДК с высоким цитотоксическим потенциалом может лечь в основу новой стратегии противоопухолевой иммунотерапии больных злокачественными глиомами.

Таким образом, данная диссертационная работа, целью которой явилось характеристика тумороцидной функции $\text{INF}\alpha$ -индуцированных ДК человека против клеток глиобластомы на основе оценки цитотоксической активности ДК против глиобластомных линий, изучение роли рецепторно- и грануло-опосредованных механизмов цитотоксичности и их регуляции, представляет собой крайне своевременное и актуальное исследование.

Научная новизна исследования и достоверность полученных данных

Научная новизна исследования заключается в том, что продемонстрирована способность $\text{INF}\alpha$ -индуцированных ДК (ИФН-ДК) эффективно лизировать клетки глиобластомных линий, полученных от различных пациентов, а также установлены ключевые механизмы цитотоксической активности ДК на модели ИФН-ДК здоровых доноров.

Автором обнаружено, что ИФН-ДК больных глиобластомой характеризуются сниженной цитотоксичностью в отношении аутологичных и аллогенных глиобластомных клеток, чувствительных к $\text{TNF}\alpha/\text{TNF-R1}$ -зависимому лизису. Получены новые данные о причинах дефекта цитотоксической активности ИФН-ДК больных глиобластомой, раскрыты возможные способы регуляции цитотоксичности ДК. Продemonстрирована роль растворимых молекул, продуцируемых глиобластомными клетками, в негативной регуляции $\text{TNF}\alpha$ -опосредованной цитотоксичности ДК. В ходе выполнения работы также показано стимулирующее влияние экзогенного интерлейкина-2 и внеклеточной двухцепочечной ДНК человека на цитотоксичность ИФН-ДК больных глиобластомой против аутологичных опухолевых клеток, и раскрыты механизмы и мишени регулирующего влияния изучаемых модуляторов.

Научно-практическая значимость

Научная и практическая значимость работы не вызывает сомнения. Результаты диссертационного исследования имеют фундаментальный характер, так как способствуют расширению знаний о тумороцидной

активности ДК против клеток глиобластомы, о клеточно-молекулярных механизмах цитотоксической активности ДК и их регуляции. Показана дефектность цитотоксического действия ДК у больных глиобластомой против аутологичных опухолевых клеток. Продemonстрировано нарушение TNF α -опосредованного механизма цитотоксичности ДК больных глиобластомой и установлены причины обнаруженного дефекта на основе анализа экспрессии мРНК TNF α , мембранной и растворимой форм TNF α в культурах ИФН-ДК больных злокачественными глиомами, а также анализа активности TNF α -конвертирующего фермента, участвующего в регуляции экспрессии двух форм молекулы TNF α . На основе данных продукции растворимых факторов клетками первичных культур глиом головного мозга и показателями TNF α -зависимой цитотоксичности ДК показано негативное влияние опухолевых клеток в регуляции эффекторной функции ДК, а также их возможное участие в нарушении TNF α -опосредованной цитотоксической активности ДК больных глиобластомой.

Достигнутые Т.В. Тыриновой результаты, касающиеся высокого уровня цитотоксической активности ИФН-ДК против клеток глиобластомы и клеток нейросфер как модели, содержащей опухолевые стволовые клетки, свидетельствуют о возможности реализации цитотоксического потенциала ДК при проведении противоопухолевой иммунотерапии. Выявленная низкая экспрессия мембранной формы TNF α вследствие нарушения экспрессии гена TNF α , высокой активности и экспрессии фермента TACE обозначили новые молекулярные мишени для направленной коррекции и регуляции TNF α -опосредованной цитотоксической активности ДК больных глиобластомой. Кроме того, в диссертационной работе определены новые перспективы практического использования рекомбинантного интерлейкина 2 и внеклеточной двухцепочечной ДНК человека для коррекции/регуляции *ex vivo* цитотоксического потенциала ИФН-ДК больных глиобластомой с целью повышения эффективности существующих протоколов иммунотерапии злокачественных глиом.

Оценка содержания работы

Диссертационная работа построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, 8 разделов собственных исследований, обсуждения, заключения и выводов. Библиографический указатель включает 8 отечественных и 347 зарубежных источников, большая часть из которых опубликована в течение последних 7 лет. Объем диссертации – 229 стр., текст проиллюстрирован 49 рисунками и 16 таблицами.

Во введении автор обосновывает выбор темы, отмечает важность исследований функций ДК не только с использованием стандартных клеточных моделей, но и близких к реальной клинической ситуации, в частности, с использованием опухолевых клеток, выделенных из организма пациентов с глиобластомой, которые могут характеризоваться крайней гетерогенностью по фенотипу и чувствительности к лизису. Кроме того, автор поднимает вопрос о предполагаемой цитотоксической дисфункции ДК у больных глиобластомой, его значимости и возможности регуляции. Цель исследования и поставленные задачи адекватны и четко сформулированы. Положения, выносимые на защиту, отражают наиболее существенные результаты проведенного исследования.

Первая глава включает обзор литературы, который посвящен роли цитотоксической активности ДК в противоопухолевом иммунном ответе. Автор приводит классификацию ДК, рассматривает механизмы цитотоксической активности, реализуемые ДК; и описывает участие ДК в механизмах иммунного редактирования опухоли. Далее автор останавливается на описании сведений, касающихся глиом головного мозга и иммунотерапевтических подходов к лечению этой группы онкологических заболеваний с помощью вакцин на основе ДК. В обзоре изложены достижения самых последних лет, что позволяет достаточно полно раскрыть состояние проблемы и проникнуть в суть научной основы диссертации.

Литературный обзор занимает 50 стр., проиллюстрирован 4 рисунками и 1 таблицей, литературные данные описаны хорошим языком и позволяют определить место и значение предпринятого исследования в системе существующих научных положений.

В главе «Материалы и методы» представлена методическая часть работы, дана подробная характеристика клинического материала: в исследование включено 109 больных глиомами головного мозга и 178 здоровых лиц в качестве контрольной группы. Использован широкий спектр современных культуральных, иммунологических и молекулярно-биологических методов, в том числе фенотипическую характеристику генерированных *in vitro* ДК здоровых лиц и больных глиобластомой. Задействованы несколько подходов для изучения цитотоксической активности ДК: МТТ-тест, проточная цитофлуориметрия для оценки апоптоза опухолевых клеток и тест на дегрануляцию. Метод многоцветной проточной цитофлуориметрии был использован автором для анализа экспрессии различных поверхностных и внутриклеточных молекул, а также транскрипционных факторов, иммуноферментный анализ и мультиплексный анализ – для исследования продукции растворимых факторов различными типами клеток, метод полимеразной цепной реакции - для оценки экспрессии генов. Была проведена оценка ферментативной активности с помощью спектрофлуориметрии. Объём изученного материала и избранные методы статистического анализа не вызывают сомнений в значимости и достоверности полученных результатов.

В восьми разделах Главы 3 описаны результаты собственных исследований. Представление данных автор начинает с характеристики используемых в последующих экспериментах 13 клеточных линий глиобластомы, полученных автором из образцов опухолей пациентов, а также коммерческой клеточной линии глиобластомы человека U-87. Далее автор отмечает гетерогенность глиобластомных линий с точки зрения различной чувствительности опухолевых клеток пациентов к

цитотоксическому действию ИФН-ДК доноров. Кроме того, представлены важные данные о цитотоксическом действии ИФН-ДК в отношении клеток, формирующих нейросферы. Несмотря на блестящее описание проведенных исследований, удручает качество представленных микрофотографий, иллюстрирующих морфологию культивируемых опухолевых клеток.

Второй раздел третьей главы посвящен изучению экспрессии проапоптогенных рецепторов суперсемейства фактора некроза опухоли на культивируемых клетках глиобластомы, в третьем разделе продемонстрирована вовлеченность этих рецепторов в реализацию цитотоксического действия ИФН-ДК доноров и исследован грануло-опосредованный механизм киллерной активности ДК. Автор составил тепловую карту, которая отражает степень вовлеченности изученных механизмов лизиса опухолевых клеток в реализацию цитотоксической активности ДК доноров против клеток глиобластомы, полученных от различных пациентов, и позволяет установить иерархию значимых сигнальных путей.

В четвертом разделе автор представил данные по изучению цитотоксической активности ИФН-ДК больных глиобластомы против аутологичных злокачественных клеток, что позволило выявить у больных дефект этой функции против опухолевых клеток, чувствительных к $\text{TNF}\alpha/\text{TNF-R1}$ -зависимому лизису.

Раздел пятый и шестой Главы 3 посвящены изучению причин выявленного снижения цитотоксической активности ДК больных глиобластомой. Автором проведен сравнительный фенотипический анализ экспрессии поверхностных и внутриклеточных цитотоксических молекул на ДК доноров и больных, который позволил выявить различия в экспрессии мембранной формы $\text{TNF}\alpha$ и установить причины $\text{TNF}\alpha$ -опосредованного нарушения цитотоксической функции ДК больных глиобластомой.

В седьмом разделе представлены результаты по исследованию влияния продуцируемых клетками глиобластомы растворимых факторов на цитотоксическую активность ИФН-ДК.

И, наконец, восьмой раздел посвящен возможным способам коррекции сниженной цитотоксической активности ДК больных глиобластомой против аутологичных опухолевых клеток. Показано, что интерлейкин-2 и внеклеточная двухцепочечная ДНК обладают корригирующим влиянием на TNF α -опосредованную цитотоксичность ИФН-ДК. В этом разделе последовательно и логично представлены данные о влиянии рекомбинантного интерлейкина-2 и экзогенной на экспрессию TNF α и цитотоксичность ДК. Продемонстрирован возможный потенциал стимулирующего эффекта указанных модуляторов на другие цитотоксические лиганды, что открывает широкие перспективы для получения ДК с выраженными киллерными свойствами в отношении различных типов опухолевых мишеней.

Глава «Обсуждение» занимает 12 стр. и содержит обсуждение полученных результатов исследования, где имеет место подробный сравнительный анализ совокупности данных, имеющих в мировой и отечественной литературе, и детальное обсуждение результатов, что дает основания для формирования полноценных выводов. Далее следует «Заключение», где автор подводит итоги своей работы.

Выводы сформулированы четко и логично, отражают полученные данные, научно обоснованы и достоверны, соответствуют поставленным задачам и отражают основные положения диссертации.

Принципиальных замечаний к диссертации нет.

В процессе ознакомления с содержанием диссертационного исследования появился ряд вопросов:

1. Соотносили ли Вы антигенный и цитокиновый профиль полученных *in vitro* ИНФ-ДК с уровнем их цитотоксической активности?

2. Рестриктированы ли рецепторно-опосредованные механизмы цитотоксичности, реализуемые ДК в непосредственном контакте с опухолевыми клетками, по МНС I класса?
3. Каким образом могут быть реализованы *in vivo* механизмы, обеспечивающие цитотоксическую активность ИНФ-ДК против культивируемых клеток глиобластомы, при исходно низкой степени лимфоидной инфильтрации опухолевой ткани?

Заключение

Актуальность, научная новизна, объем и глубина проведенных исследований, современное методическое обеспечение работы, достоверность полученных данных, практическая значимость результатов, полнота изложения материалов диссертации в опубликованных работах позволяют заключить, что диссертационная работа Тыриновой Тамары Викторовны является завершенной научной квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований осуществлено решение актуальной научной проблемы - характеристика тумороцидной функции $INF\alpha$ -индуцированных ДК человека против клеток глиобластомы и изучение роли и регуляции рецепторно- и грануло-опосредованных механизмов цитотоксичности, имеющей существенное теоретическое и практическое значение для иммунологии и онкологии.

По актуальности избранной темы, поставленным задачам, новизне и значимости полученных результатов, обоснованности научных выводов диссертационная работа Тыриновой Т.В. соответствует требованиям ВАК РФ к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук в п.9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 (в редакции постановления Правительства Российской Федерации от 21.04.2016 г. № 335, от 02.08.2016 г. № 748, от 29.05.2017 г. №650, от 28.08.2017 г. № 1024, от 01.10.2018 г. № 1168). Автор Тыринова Тамара Викторовна достойна

присуждения ей ученой степени доктора биологических наук по специальности 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология.

Официальный оппонент

Заведующий научным отделом онкоиммунологии
Федерального государственного бюджетного учреждения
«Национальный медицинский исследовательский центр
онкологии имени Н.Н. Петрова»
Министерства здравоохранения
Российской Федерации,
доктор медицинских наук,
Балдуева Ирина Александровна _____

05.09.2019 г.

Адрес организации: Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр онкологии
имени Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации
Адрес: Россия, 197758, Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская,
д.68
<https://www.niioncologii.ru> E-mail: oncl@rion.spb.ru тел.: 8(812)439-95-55
Адрес электронной почты: biahome@mail.ru

Подпись д.м.н. Балдуевой И.А. заверяю

Ученый секретарь _____ к.б.н. Киреева Г.С.

