

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу

**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 выполненной работы**

Опухоли головного мозга являются актуальной проблемой в современной нейрохирургии, что связано с ростом нейроонкологической заболеваемости, высокой летальностью и степенью инвалидизации больных. Развитие опухоли сопровождается быстрой пролиферацией, потерей дифференциации, перепрограммированием энергетического метаболизма, потерей адгезии между клетками и опухолевым матриксом, уклонением от иммунного надзора вследствие нарушения эффекторной функции дендритных клеток и иммуносупрессией. Глиобластома представляет собой одну из самых высоко злокачественных и агрессивных форм опухолей головного мозга у человека и не является исключением в плане уклонения от иммунного надзора. Поэтому особый интерес представляет «восполнение» недостаточности функций дендритных клеток при этом типе заболевания и поиск систем коррекции несостоятельности противоопухолевой защиты.

На сегодняшний день все большее положение в лечении опухолей занимают методы коррекции с помощью иммунотерапии, и особое место среди них занимают дендритно-клеточные вакцины, запускающий противоопухолевый цитотоксический ответ за счет активации наивных Т-клеток и эффекторных CD8<sup>+</sup> Т-клеток. Однако, дендритные клетки помимо ведущей роли в запуске специфического противоопухолевого иммунного ответа, обладают самостоятельной киллерной функцией и способны напрямую инициировать гибель опухолевых клеток.

Таким образом, работа Тыриновой Т.В., целью которой явилось исследование тумороцидной функции IFN $\alpha$ -индуцированных дендритных клеток человека против клеток глиобластомных линий, изучение вклада рецепторно- и грануло-опосредованных механизмов цитотоксичности дендритных клеток в наблюдаемую тумороцидную активность, представляет собой крайне актуальное исследование.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертационная работа Тыриновой Т.В. построена по традиционной схеме и состоит из введения, 4 глав, содержащих обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты собственных исследований с их обсуждением, выводов и списка литературы. Работа изложена на 229 страницах машинописного текста, содержит 16 таблиц, 49 рисунков и список цитируемой литературы из 335 источников.

Во введении автор формулирует цели и задачи своей работы, обосновывает актуальность и степень разработанности темы исследования, оценивает научную новизну и потенциальную практическую значимость результатов, обосновывает методологию и метод исследования, формулирует положения, выносимые на защиту.

Глава 1, содержащая обзор литературы, состоит из 7 разделов, и посвящена роли цитотоксической активности дендритных клеток в противоопухолевом иммунном ответе.

Автором подробно рассмотрена общая характеристика и классификация ДК, принципы и механизмы киллерной функции эффекторных клеток, в том числе и самих ДК, клетки-мишени цитотоксических ДК. Также в обзоре освещена регуляция тумороцидной активности ДК и роль этой активности в иммунном надзоре при опухолевом росте. Обзор написан достаточно интересно и глубоко, отражает современные представления о предмете исследования и свидетельствует о высокой квалификации автора в области иммунобиологии.



Следует отметить, что обзор литературы в диссертации вполне может быть включен в программы преподавания иммунологических дисциплин в медицинских и биологических ВУЗах.

Глава 2, содержащая описание материалов и методов, описывает научно-методологические подходы, примененные автором для решения поставленных задач и достижения цели исследования, включая характеристику пациентов. В исследовании используется широкий спектр современных иммунологических и молекулярно-биологических методов, включая такие как получение первичных культур клеток глиомных опухолей головного мозга человека и культивирование их в нейросфер, получение ДК и генерация из них IFN $\alpha$ -индуцированных ДК (ИФН-ДК), исследование экспрессии поверхностных и внутриклеточных молекул ДК с помощью проточной цитометрии, ИФА, исследование цитотоксической активности ДК и количественный ПЦР в режиме реального времени. Все методики, использованные в исследовании, детально прописаны и пояснены.

Глава 3 посвящена изложению и обсуждению результатов исследования цитотоксической активности ИФН-индуцированных ДК как здоровых доноров так и больных глиобластомой против опухолевых клеток глиобластомных линий. Автором подробно исследованы сигнальные пути, вовлеченные в реализацию цитотоксической функции ИФН-индуцированных ДК против клеток глиобластомных линий, и рассмотрен вклад рецепторно- и грануло-опосредованной цитотоксической активности. В заключительной части Главы 3 автором изложены результаты модуляции противоопухолевой цитотоксической активности ИФН-индуцированных ДК больных глиобластомой с помощью ИЛ-2 и двуцепочечной ДНК. Интересные результаты получены автором при исследовании цитотоксической активности ДНК против клеток нейросфер, формируемых клетками глиобластомных линий. Результаты проиллюстрированы многочисленными рисунками, которые облегчают восприятие материала.

Достоверность полученных результатов подтверждается статистической обработкой данных с использованием корректно подобранных критериев и тестов. Выводы основываются на фактически полученном автором материале и отражают суть проведенного экспериментального исследования. Автор выносит на защиту 4 научных положения, логично вытекающие из анализа результатов исследования и в достаточной степени аргументированные полученными результатами. Обоснованность научных положений и выводов, таким образом, не вызывает сомнений. Материал, представленный в диссертации, получен и проанализирован автором исследования лично или при его непосредственном участии.

### **Научная новизна и научно-практическая значимость полученных результатов**

Автором впервые детально охарактеризована способность ИФНа-индуцированных ДК лизировать линии первичных глиобластомных клеток и показано, что цитотоксическая активность ИФНа-ДК реализуется с участием как рецепторно-опосредованных механизмов, так перфорин/гранзим Б-зависимого механизма, с преобладающим вкладом грануло-зависимого и  $\text{TNF}\alpha/\text{TNF-R1}$ -зависимого сигнального пути. Тыриновой Т.В. показано, что низкая цитотоксическая активность ИФНа-ДК пациентов с глиобластомой в отношении аутологичных и аллогенных опухолевых клеток ассоциирована с нарушением  $\text{TNF}\alpha/\text{TNF-R1}$ -опосредованной цитотоксичности.

Продемонстрирована способность растворимых факторов, секретируемых глиобластомными клетками первичных опухолевых линий, оказывать как ингибирующее, так и стимулирующее влияние на  $\text{TNF}\alpha$ -опосредованную цитотоксическую активность ИФН-ДК. Установлено, что цитотоксическая активность ИФНа-ДК больных глиобластомой против аутологичных опухолевых клеток повышается при стимуляции экспрессии мембранной формы  $\text{TNF}\alpha$ , перфорины и гранзима по действием экзогенного

ИЛ-2 и внеклеточной двуцепочечной ДНК человека. Впервые показано, что регулирующее влияние двуцепочечной ДНК на  $\text{TNF}\alpha$ -опосредованную цитотоксическую активность ДК ассоциируется с увеличением экспрессии мРНК  $\text{TNF}\alpha$ , а также снижением экспрессии и ослаблением активности  $\text{TNF}\alpha$ -конвертирующего фермента. В совокупности полученные результаты вносят большой вклад в расширение знаний о функции ДК с точки зрения клеток-эффекторов врожденного иммунитета.

Научно-практическая значимость работы заключается в полученных данных о причинах дефекта цитотоксической функции ДК у больных глиобластомой, что позволит разработать новые обходные перспективные стратегии противоопухолевой иммунотерапии, направленные на элиминацию опухолевых клеток у пациентов с злокачественными глиомами головного мозга.

### **Достоверность и обоснованность результатов исследований**

Достоверность полученных результатов обеспечена использованием широкого спектра современных иммунологических и молекулярно-биологических методов исследований, детальным анализом полученных данных и корректными способами статистической обработки.

Опубликованы в 27 печатных работах (в том числе в 15 работах в отечественных журналах, рекомендованных Перечнем ВАК РФ, и в 3 статьях и 3 тезисах в зарубежных журналах, индексируемых в базах Web of Science и Scopus), доложены и обсуждены на 11 всероссийских и международных научных форумах и конференциях и представлены в виде одного патента РФ.

Следует отметить небольшое количество замечаний и возникших в ходе изучения работы вопросов.

1. Рис. 2.1 приведен в Материалах и Методах, тем не менее, очевидно, что ему место в Результаты, поскольку он представляет фенотипическую характеристику ИФН-ДК здоровых доноров и больных глиобластомой.



2. Ссылки пронумерованы не по порядку цитирования. Первая ссылка во введении 23, следующая за ней – 228.

3. Клеточная линия U-87 имеет высокий уровень экспрессии TNF $\alpha$ -R1, но не чувствительна к цитотоксическому действию ИФН-индуцированных ДК, реализующемуся по TNF $\alpha$ /TNF $\alpha$ -R1-опосредованному механизму. Чем автор может это объяснить?

4. Цитотоксическая активность ИФН-индуцированных ДК против нейросфер была ниже, чем против монослойных клеток той же линии, чем вы можете это объяснить?

В работе присутствует некоторое количество сленговых терминов и англицизмов. Однако, сделанные замечания имеют дискуссионный характер, не снижают научной ценности полученных результатов и сделанных выводов и ни в коей мере не умаляют хорошего впечатления от работы.

### **Заключение**

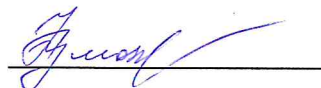
В целом, диссертационная работа Тыриновой Тамары Викторовны по своей актуальности, научной новизне и практической значимости результатов, объему и глубине проведенных исследований, достоверности полученных результатов и полноте изложения результатов диссертации в опубликованных работах, является законченной самостоятельной научно-квалификационной работой, проведенной на высоком научно-методологическом уровне, в которой решена актуальная научная проблема – всесторонне исследована опухолюцидная функция IFN $\alpha$ -индуцированных дендритных клеток человека против клеток глиобластомных линий и выявлен вклад рецепторно- и грануло-опосредованных механизмов цитотоксичности дендритных клеток в наблюдаемую опухолюцидную активность.

Автореферат полностью отражает основное содержание диссертации, оформлен в соответствии с требованиями, установленными «Положением о присуждении ученых степеней».

На основе всего вышеизложенного можно заключить, что диссертационная работа Тыриновой Т.В. является цельным законченным научным исследованием и соответствует критериям, предъявляемым к докторским диссертациям согласно «Положению о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. №842 (в ред. Постановлений Правительства РФ №335 от 21.04.2016, №748 от 02.08.2016, №650 от 29.05.2017, №1024 от 28.08.2017, №1168 от 01.10.2018 «О внесении изменений в Положение о присуждении ученых степеней»), а сама Тыринова Тамара Викторовна, несомненно, заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология.

Официальный оппонент,  
Доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биохимии нуклеиновых кислот Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт химической биологии и фундаментальной медицины» Сибирского отделения Российской академии наук (ИХБФМ СО РАН).

Н.Л. Миронова



Адрес организации: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук.

Адрес: 630090, Россия, г. Новосибирск, проспект Лаврентьева 8.

www.niboch.nsc.ru, e-mail: [miroнова@niboch.nsc.ru](mailto:miroнова@niboch.nsc.ru), +7(383)3635161

Подпись д.б.н. Н.Л. Мироновой заверяю:



П.Е. Пестряков

М.П.

Ученый секретарь ИХБФМ СО РАН,  
Кандидат химических наук