

О Т З Ы В

официального оппонента доктора медицинских наук Повещенко Ольги Владимировны 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

Актуальность исследования не вызывает сомнения и обусловлена тем, что глиобластомы, несмотря на всю проводимую терапию, являются одной из наиболее злокачественных и агрессивных форм опухолей у человека. С другой стороны, взаимодействие эффекторных клеток иммунной системы и опухолевых клеток-мишеней является, безусловно, одной из наиболее актуальных научных проблем в области исследований противоопухолевого иммунитета. Дендритные клетки (ДК) как профессиональные антигенпрезентирующие клетки наряду с антигенпрезентирующей функцией способны напрямую оказывать цитотоксическое действие на опухолевые клетки. Однако эта функция ДК является наименее изученной и вызывает много вопросов как относительно ее роли в противоопухолевом иммунном ответе, так и механизмов действия.

В этом аспекте диссертационная работа Тыриновой Тамары Викторовны посвящена важным вопросам, которые позволяют на модели ДК, генерированных из моноцитов периферической крови в присутствии интерферона альфа (ИФН-ДК), лучше понять цитотоксическую функцию ДК:

- обладают ли цитотоксической активностью ДК здоровых доноров против опухолевых клеток различных глиобластомных линий и какие механизмы вовлечены в реализацию этой функции;
- изменяется ли цитотоксическая активность ИФН-ДК больных злокачественными глиомами;
- оказывают ли опухолевые клетки паракринное влияние на цитотоксическое действие ИФН-ДК;
- возможно ли усилить цитотоксическую активность ИФН-ДК больных глиобластомой.

Соответствие темы диссертации научной специальности

Тема диссертационной работы Тыриновой Т.В. соответствует заявленной специальности 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология (согласно паспорту ВАК научной специальности: «посвящена изучению иммунитета и его нарушений, а также созданию методов диагностики, профилактики и лечения заболеваний, связанных с нарушениями в системе иммунитета).

Новизна исследования, полученных результатов и выводов, сформулированных в диссертации

Все результаты исследования являются новыми, впервые полученными автором и опубликованными в научных журналах отечественных и зарубежных журналах высокого уровня.

В частности, автором впервые охарактеризовано цитотоксическое действие интерферон альфа – индуцированных ДК против клеток глиобластомных линий, полученных из первичных культур, с детальным изучением основных механизмов, вовлеченных в реализацию киллерной функции ДК. В системе аутологических и аллогенных опухолевых культур впервые выявлено снижение $\text{TNF}\alpha/\text{TNF-R1}$ -опосредованной цитотоксической активности ДК больных глиобластомой против клеток глиобластомных линий, а также установлены причины этого нарушения. Впервые проведен анализ широкого спектра растворимых факторов, секретируемых клетками глиальных опухолей различной степени злокачественности, и показана связь между продукцией клетками глиобластомы ряда цитокинов и низкой $\text{TNF}\alpha$ -опосредованной цитотоксической активностью ДК. Новизну исследования составляют данные о способности экзогенного интерлейкина 2 и внеклеточной двуцепочечной ДНК человека стимулировать экспрессию цитотоксических лигандов на ДК, а также повышать цитотоксическую активность ДК больных глиобластомой против аутологических опухолевых клеток.

Таким образом, все результаты исследования оригинальны и интересны для научного сообщества.

Научно-практическая значимость

Научная значимость исследования несомненна, поскольку затрагивает малоизученное свойство дендритных клеток выступать в роли эффекторных клеток врожденного иммунитета. При этом использование в качестве клеток-мишеней линий глиобластомы, полученных непосредственно из опухоли пациентов, имеет большое значение для понимания клеточных и молекулярных механизмов развития противоопухолевого иммунного ответа при глиобластоме. Результаты диссертации открывают новые направления научных исследований взаимодействия опухоли и клеток иммунной системы, внося весомый вклад в формирование современной модели иммуноредактирования опухоли.

Выявленные причины нарушенной цитотоксической активности ДК у больных глиобластомой против аутологических опухолевых клеток, а также исследованные в работе способы коррекции этой функции позволяют транслировать полученные данные в клиническую практику с целью повышения эффективности иммунотерапии при злокачественных опухолях.

Степень обоснованности и достоверность научных положений и выводов, сформулированных в диссертации

Диссертация Тыриновой Т.В. выполнена на высоком научном и методическом уровне. Выборка доноров и пациентов соответствует поставленной

цели и задачам исследования и достаточна по объему для формирования обоснованных выводов. Сформулированные автором цель исследования и алгоритм поставленных задач последователен и логичен, и соответствуют теме исследования. Все исследования проведены на сертифицированном и откалиброванном оборудовании. Результаты обработаны с помощью адекватных статистических методов и достоверны. Выводы диссертации четко сформулированы и полностью обоснованы полученными результатами в соответствии с поставленными целью и задачами. Достоверность полученных данных также подтверждена опубликованными 27 печатными работами в журналах, рекомендованных ВАК РФ, а также индексируемых в базах Scopus и Web of Science.

Оценка содержания и завершенности диссертации

Работа написана в классическом стиле и включает в себя введение, обзор данных литературы, главу «Материалы и методы», 8 глав собственных исследований, обсуждение, заключение и выводы. Диссертация изложена на 229 страницах, хорошо иллюстрирована. Цитируется 355 литературных источников, из которых 347 представлены зарубежными публикациями.

Введение очень подробно обосновывает актуальность и освещает степень разработанности темы исследования, представлены цель и задачи исследования, научная новизна, теоретическая и практическая значимость исследования, положения, выносимые на защиту.

Литературный обзор производит хорошее впечатление. Материал изложен логично и последовательно. В конце автор делает заключение, которое резюмирует круг проблем относительно противоопухолевой цитотоксической функции ДК.

В главе «Материалы и методы» представлена краткая характеристика больных, подробно и обстоятельно описаны все экспериментальные процедуры, задействованные в процессе выполнения диссертационной работы. Методики представлены весьма подробно, что не оставляет сомнений в возможности их воспроизведения. Описана статистическая обработка данных.

Глава 3 посвящена результатам собственных исследований. Порядок изложения построен таким образом, что описание полученных результатов во всех главах сопровождается их анализом, после чего следует резюме и логический переход к последующим исследованиям.

В первом разделе главы 3 автор характеризует фенотип и пролиферативную активность полученных от пациентов глиобластомных линий, используя в качестве контроля глиобластомную линию U-87. Исходя из полученных автором данных, можно заключить, что гетерогенность опухолей, обусловленная индивидуальными различиями между пациентами с глиобластомой, определяет различную чувствительность полученных глиобластомных линий пациентов к цитотоксическому действию ДК доноров. Безусловно, украшением работы является получение нейросфер из клеточной линии. Известно, что это

кропотливая работа по подбору условий культивирования. Автором продемонстрирован фенотип клеток нейросфер и показано, что цитотоксическая контактная активность ДК также проявляется в отношении нейросфер, что может иметь важное значение для эффективной элиминации опухолевых клеток, поскольку формирование нейросфер в культуре ассоциируется с присутствием в опухоли стволовых опухолевых клеток.

Во втором и третьем разделе главы собственных результатов автор ставит вопрос о механизмах реализации цитотоксической функции ДК, определяя экспрессию проапоптогенных рецепторов на клетках глиобластомных линий. Для большей наглядности в качестве контрольных культур автором использована линия U-87. Далее автор, чтобы оценить вклад рецептор-опосредованных механизмов цитотоксичности (раздел 3 Главы 3) применяет подход использования растворимых рецепторов для нейтрализации действия лигандов, экспрессируемых на ДК. Учитывая тот факт, что блокирование рецепторно-опосредованных сигнальных путей приводит только к частичной нейтрализации цитотоксического действия ДК, встает вопрос о существовании других механизмов цитотоксического действия ИФН-ДК против глиобластомных клеток. Автор исследует другой механизм действия ИФН-ДК доноров – грануло-опосредованную цитотоксичность с блокированием перфорин/гранзим Б - зависимого цитолиза опухолевых клеток. Важно то, что автор ищет закономерности обоснования гетерогенности полученных результатов. Суммируя полученные данные, автор представляет тепловую карту удельного вклада основных сигнальных путей в реализацию цитотоксической активности ИФН-ДК доноров против клеток глиобластомы, что иллюстративно позволяет оценить гетерогенность полученных результатов, но все же определить два основных механизма, которые обеспечивают реализацию цитотоксической активности ИФН-ДК против большинства глиобластомных линий, полученных из фрагментов опухоли пациентов - грануло-опосредованный и $\text{TNF}\alpha/\text{TNF-R1}$ -зависимый.

Следующие два раздела Главы 3 посвящены исследованию цитотоксической активности ДК уже больных глиобластомой против аутологичных опухолевых клеток. Алгоритм исследования тот же – от исследования цитотоксической активности до изучения ее механизмов. Закономерно, что опухолевый рост влияет на функциональное состояние клеток иммунной системы. Это находит отражение в продемонстрированном автором нарушении $\text{TNF}\alpha$ -зависимой цитотоксичности ДК у больных глиобластомой. В этом аспекте важно то, что автор показал сохранность экспрессии других лигандов и, прежде всего, перфорина и гранзима Б, как второго возможного механизма цитотоксической активности.

В шестом разделе Главы 3 показано два уровня нарушения экспрессии $\text{TNF}\alpha$.

Известно, что ускользание опухоли от иммунного надзора и опухолевая прогрессия обусловлено паракринным влиянием опухолевого микроокружения.

Седьмой раздел главы 3 посвящен исследованию влияния суммарного секреторного продукта первичных клеточных культур опухолей пациентов и VEGF на цитотоксическую активность ДК в отношении клеток-мишеней HEp-2 как модели $TNF\alpha/TNF-R1$ -опосредованной цитотоксичности ДК. Результаты мультиплексного анализа 27 цитокинов представлены в тепловой карте по уровням продукции первичных клеточных культур низкой и высокой степени злокачественности. Для анализа цитокины разделены на группы - про- и противовоспалительные, иммунорегуляторные, ростовые факторы, хемокины. Исследуются различные взаимосвязи между уровнями цитокинов, различия уровней при глиомах высокой и низкой степени злокачественности. Автором определены различия во влиянии супернатантов на цитотоксичность ИФН-ДК доноров. Поскольку первичные культуры отражают функциональные особенности исходной опухоли, такой подход позволил установить потенциальные факторы, секретируемые опухолевыми клетками, которые, по всей видимости, на системном уровне влияют на моноцитарные предшественники, результатом чего являются фенотипические и функциональные нарушения ДК, в том числе и нарушение экспрессии $TNF\alpha$.

Логичным завершением проведенного исследования является решение вопроса о возможности модуляции противоопухолевой цитотоксической активности ИФН-ДК больных глиобластомой, чему посвящен **восьмой раздел главы собственных результатов**, самый объемный раздел Главы 3. В качестве кандидатов на роль модуляторов выступают интерлейкин-2 и двуцепочечная ДНК человека. С точки зрения очевидных преимуществ аутологичной клеточной терапии проведенные исследования свидетельствуют о том, что генерированные ИФН-ДК с высоким цитотоксическим потенциалом могут стать новой стратегией противоопухолевой иммунотерапии.

Глава «Обсуждение» посвящена сравнению собственных результатов исследования с данными других авторов, проводится аргументированное объяснение полученных результатов в соответствии с имеющимися на сегодняшний день представлениями.

Итоги работы подведены в разделе **«Заключение»**.

Выводы дают четкие ответы на вопросы, поставленные целью и задачами исследования.

Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

В целом диссертация Тыриновой Т. В. производит хорошее впечатление, она современна, высокотехнологична, конкретна, обладает внутренним единством, написана заинтересованно, хорошим литературным языком. Работа хорошо иллюстрирована, встречаются единичные опечатки и неудачные выражения, но они не умаляют достоинств работы.

Вопросы к автору носят дискуссионный характер:

1. Известно, что CD133 является маркером опухолевых клеток со стволовыми свойствами, и уровень его экспрессии определяет пролиферацию клеток. С чем связано отсутствие экспрессии данного маркера на полученных нейросферах?

2. ДК обладали цитотоксичностью при соотношении эффектор/мишень 1:1. Насколько такое соотношение может быть эффективным при проведении ДК вакцинации?

Материалы диссертации могут использоваться в программах преподавания иммунологии в медицинских и биологических ВУЗах, а также могут быть включены в программы клинической ординатуры и аспирантуры. Результаты диссертационной работы могут быть применены при разработке новых эффективных методов иммунотерапии онкологических заболеваний с использованием вакцин на основе ДК

Заключение

Диссертационная работа Тыриновой Тамары Викторовны «Цитотоксическая активность дендритных клеток против клеток глиобластомы: медиаторы, механизмы регуляции и возможности направленной коррекции» является завершенной научно-квалификационной работой, в которой разработаны теоретические положения, совокупность которых можно определить как крупное научное достижение в области иммунологии, развивающее представление о роли дендритных клеток в качестве эффекторных клеток противоопухолевого иммунного ответа и позволяющее использовать это свойство для создания эффективной клеточной платформы в иммунотерапии глиобластомы.

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

Официальный оппонент:

Заведующая лабораторией
клеточных технологий НИИКЭЛ филиал
ФИЦ ИЦИГ СО РАН
доктор медицинских наук



Повещенко О.В.

630117, Россия, г. Новосибирск,
ул. Тимакова, 2,
тел. (383) 333-64-09,
<http://niikelsoramn.ru/>
E-mail: lymphology@niikel.ru

10.09.2019 г.

Подпись д.м.н. Повещенко О.В. заверяю

Ученый секретарь



Власова Н.В.