

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 001.001.01 НА БАЗЕ  
ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО НАУЧНОГО  
УЧРЕЖДЕНИЯ «НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ  
ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ И КЛИНИЧЕСКОЙ ИММУНОЛОГИИ» ПО  
ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ ДОКТОРА НАУК

аттестационное дело № \_\_\_\_\_

решение диссертационного совета от 22 октября 2019 № 258

О присуждении Тыриновой Тамаре Викторовне, гражданке РФ, ученой степени доктора биологических наук.

Диссертация «Цитотоксическая активность дендритных клеток против клеток глиобластомы: медиаторы, механизмы регуляции и возможности направленной коррекции» по специальности 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология принята к защите 28 июня 2019 года, протокол № 252 диссертационным советом Д001.001.01 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» (НИИФКИ), почтовый индекс 630099, адрес организации: г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, дом 14, действующего на основании приказа Минобрнауки России № 714 от 02.11.2012 года.

Соискатель Тыринова Тамара Викторовна, 1985 года рождения, диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических наук на тему «Естественная цитотоксическая активность дендритных клеток против клеток опухолевых линий и активированных лимфоцитов» защитила в 2012 году в диссертационном совете Д001.001.01, созданном на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», диплом кандидата наук серия ДКН № 162790 от 20.07.2012 г.

Работает в должности научного сотрудника лаборатории клеточной иммунотерапии Федерального государственного бюджетного научного

учреждения «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии».

Диссертация выполнена в лаборатории клеточной иммунотерапии клинического отдела Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии».

**Научный консультант** – доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент Российской академии наук, Черных Елена Рэмовна, заместитель директора по научной работе, заведующая лабораторией клеточной иммунотерапии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии».

#### **Официальные оппоненты:**

**Миронова Надежда Львовна**, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биохимии нуклеиновых кислот, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт химической биологии и фундаментальной медицины» Сибирского отделения Российской академии наук;

**Повещенко Ольга Владимировна**, доктор медицинских наук, заведующая лабораторией клеточных технологий, Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук»;

**Балдуева Ирина Александровна**, доктор медицинских наук, заведующая научным отделом онкоиммунологии, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, дали положительные отзывы на диссертацию.

**Ведущая организация** Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Томский национальный исследовательский медицинский центр



Российской академии наук» (Томский НИМЦ), г. Томск, в своем положительном заключении, подписанном Чердынцевой Надеждой Викторовной, доктором биологических наук, профессором, членом-корреспондентом Российской академии наук, заместителем директора по научной работе Томского НИМЦ, заведующей лабораторией молекулярной онкологии и иммунологии НИИ онкологии Томского НИМЦ, **указала, что** диссертационная работа Тыриновой Тамары Викторовны является самостоятельным завершенным научно-квалификационным исследованием, совокупность положений которого можно обозначить как крупное научное достижение в решении важной проблемы – понимания клеточных и молекулярных механизмов развития противоопухолевого иммунного ответа при глиобластоме, а также определения перспективных стратегий, направленных на элиминацию опухолевых клеток у пациентов со злокачественными глиомами головного мозга. По своей актуальности, объему, уровню выполнения, качеству проведенных исследований, высокой научной и практической новизны полученных результатов 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 сентября 2013 г. №842 с изменениями от 21 апреля 2016 г. №335), а сама автор достойна присуждения ей ученой степени доктора биологических наук по специальности 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология.

Соискатель имеет 27 опубликованных по теме диссертации работ, в том числе 15 статей в научных журналах и изданиях, которые включены в перечень российских рецензируемых научных журналов и изданий для опубликования основных научных результатов диссертаций, 3 статьи в зарубежных журналах, индексируемых в базах Web of Science и Scopus, а также получен 1 патент.

Наиболее значимые научные работы по теме диссертации:

1. Tyrinova T.V. Cytotoxic activity of ex-vivo generated IFN $\alpha$ -induced monocyte-derived dendritic cells in brain glioma patients / T.V. Tyrinova, O.Yu. Leplina, S.V. Mishinov, M.A. Tikhonova, E.Ya. Shevela, V.V. Stupak, I.V. Pendyurin,

- A.G. Shilov, E.A. Alyamkina, N.V. Rubtsova, S.S. Bogachev, A.A. Ostanin, E.R. Chernykh // *Cellular Immunology*. – 2013. – Vol. 284 (1-2). – P. 146-153.
2. Leplina O.Y. Interferon alpha induces generation of semi-mature dendritic cells with high pro-inflammatory and cytotoxic potential / O.Y. Leplina, T.V. Tyrinova, M.A. Tikhonova, A.A. Ostanin, E.R. Chernykh // *Cytokine*. – 2015. – Vol. 71(1). – P. 1-7.
  3. Тыринова Т.В. Нарушение цитотоксической активности дендритных клеток у больных с опухолями головного мозга: механизмы и возможности коррекции / Т.В. Тыринова, О.Ю. Леплина, С.В. Мишинов, М.А. Тихонова, А.В. Калиновский, С.В. Чернов, Е.В. Долгова, Е.А. Поттер, С.С. Богачев, В.В. Ступак, А.А. Останин, Е.Р. Черных // *Иммунология*. – 2016. – Т.37. - №5. – С. 246-252.
  4. Тыринова Т.В. Участие перфорины/гранзим Б - зависимого механизма в реализации цитотоксического эффекта дендритных клеток против клеток глиобластомы человека / Т.В. Тыринова, О.Ю. Леплина, С.В. Мишинов, М.А. Тихонова, А.В. Калиновский, С.В. Чернов, В.В. Ступак, А.А. Останин, Е.Р. Черных // *Медицинская иммунология*. – 2017. – Т19. - №4. – С. 421-430.
  5. Тыринова Т.В. Роль TNF $\alpha$ /TNF-R1-сигнального пути в реализации цитотоксического эффекта дендритных клеток против глиобластомных линий / Т.В. Тыринова, С.В. Мишинов, О.Ю. Леплина, А.А. Альшевская, Ю.Д. Курочкина, Е.А. Олейник, А.В. Калиновский, Ю.А. Лопатникова, С.В. Чернов, В.В. Ступак, С.В. Сенников, А.А. Останин, Е.Р. Черных // *Медицинская иммунология*. – 2018. – Т.20. - № 3. – С. 353-364.
  6. Tyrinova T. Defective dendritic cell cytotoxic activity of high-grade glioma patients' results from the low expression of membrane TNF $\alpha$  and can be corrected in vitro by treatment with recombinant IL-2 or exogenic double-stranded DNA / T. Tyrinova, O. Leplina, S. Mishinov, M. Tikhonova, A. Kalinovskiy, S. Chernov, E. Dolgova, V. Stupak, E. Voronina, S. Bogachev, E. Shevela, A. Ostanin, E. Chernykh // *J. Interferon Cytokine Res*. – 2018. – Vol.38. – № 7. – P.298-310.



7. Tyrinova T. V. Membrane TNF $\alpha$ : importance for the effector function of dendritic cells and potential ways of its targeted modulation / T.V. Tyrinova, S.V. Mishinov, O.Yu. Leplina, E.V. Dolgova, A.S. Proskurina, E.V. Batorov, M.A. Tikhonova, Yu.D. Kurochkina, E.A. Oleynik, A.V. Kalinovskiy, S.V. Chernov, V.V. Stupak, S.S. Bogachev, A.A. Ostanin, E.R. Chernykh // Biochemistry (Moscow), supplement series A: membrane and cell biology. – 2018. – Vol. 12. – № 3. – P. 247-254.

Все основные результаты, представленные на защиту, опубликованы в оригинальных статьях в рецензируемых изданиях и тезисах докладов в сборниках научных конференций. Основные экспериментальные и клинические результаты, их статистическая обработка и представление в виде публикаций выполнены соискателем лично.

На автореферат поступило 5 отзывов:

- 1) доктора биологических наук, ведущего научного сотрудника отделения модификаторов и протекторов противоопухолевой терапии Московского научно-исследовательского онкологического института им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский радиологический центр» Минздрава России **Кармаковой Татьяны Анатольевны**;
- 2) доктора медицинских наук, профессора, руководителя научного направления Научно-Исследовательского института медицинских проблем Севера-обособленного подразделения ФИЦ КНЦ СО РАН **Смирновой Светланы Витальевны**;
- 3) доктора медицинских наук, профессора, заслуженного деятеля науки РФ, заведующего лабораторией иммунорегуляции Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук (ИЭГМ УрО РАН) Федерального государственного бюджетного учреждения науки Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН **Ширшева Сергея Викторовича**;
- 4) доктора медицинских наук, профессор, лауреата премии Правительства РФ, заслуженного деятеля науки РФ, заведующего лабораторией

клеточного иммунитета Научно-исследовательского института экспериментальной диагностики и терапии опухолей Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России **Киселевского Михаила Валентиновича;**

- 5) доктора медицинских наук, профессора, заведующего отделом иммунодиагностики и иммунокоррекции ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России **Пинегина Бориса Владимировича.**

Во всех отзывах отмечается высокая актуальность темы диссертационного исследования, научная и практическая значимость, грамотно продуманный подход к формулировке цели и задач исследования, построение дизайна исследования, а результаты раскрывают большой объем работы, проведенный соискателем. Среди полученных результатов указывается отличительное достоинство работы – изучение цитотоксической активности дендритных клеток (ДК) проведено против клеток злокачественной глиомы человека, полученных из первичных культур; сравнение ДК здоровых доноров и больных глиобластомой позволяет установить возможные причины дефекта цитотоксической активности ДК у больных, обозначить новые перспективные мишени для направленной коррекции иммунных нарушений, а также создает новые возможности для использования ДК в противоопухолевой иммунотерапии злокачественных глиом. Все отзывы положительные, критических замечаний не содержат.

Выбор ведущей организации обосновывается тем, что **Томский НИМЦ** является одним из крупных и авторитетных научно-медицинских центров России, интегрированный в мировое научное пространство и осуществляющий комплексное решение фундаментальных и практических проблем современной онкологии и иммунологии. В подразделениях Томского НИМЦ активно проводятся фундаментальные исследования по изучению закономерностей распространения и механизмов патогенеза злокачественных новообразований, разработке программ по ранней диагностике, профилактике и совершенствованию организации онкологической помощи населению региона. В



контексте изучения роли иммунной системы в патогенезе злокачественного роста ведущее место в структуре Томского НИМЦ принадлежит лаборатории молекулярной онкологии и иммунологии НИИ онкологии. Сфера научных интересов сотрудников связана также с поиском иммунологических критериев прогноза клинического течения онкологических заболеваний и эффективности их лечения. Указанные направления отражены в многочисленных публикациях сотрудников.

Выбор официального оппонента, доктора биологических наук **Н.Л. Мироновой**, обосновывается ее достижениями в области исследования способов получения вакцин на основе дендритных клеток с высокой противоопухолевой активностью, поиске иммуногенных опухоль-ассоциированных антигенов и систем их доставки в дендритные клетки.

Выбор официального оппонента, доктора медицинских наук **О.В. Повещенко**, обосновывается ее достижениями в области клеточных технологий, разработками новых биомедицинских клеточных и тканеинженерных продуктов на основе аутологичных стволовых/прогениторных клеток костного мозга и периферической крови при различных патологических состояниях.

Выбор официального оппонента, доктора медицинских наук **И.А. Балдуевой**, обосновывается ее достижениями в области научных исследований, посвященных поиску новых подходов к стандартному лечению злокачественных новообразований на основе разработки и апробации новых методов иммунотерапии (в том числе костномозговыми предшественниками дендритных клеток), на основе изучения молекулярно-генетических и иммунобиологических свойств опухоли и опухолевого микроокружения, функций стволовых раковых клеток, а также методических особенностей получения первичных культур и клеточных линий злокачественных новообразований человека.

**Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:**

**разработана** новая научная идея, раскрывающая роль цитотоксической функции дендритных клеток в развитии противоопухолевого иммунного ответа при глиобластоме;

**доказано**, что цитотоксическая активность интерферон альфа-индуцированных ДК (ИФН-ДК) против глиобластомных клеток реализуется с участием рецепторно-опосредованных ( $\text{TNF}\alpha/\text{TNF-R1}$ -,  $\text{FasL}/\text{Fas}$ -,  $\text{TRAIL}/\text{TRAIL-R2}$ -зависимых) механизмов и перфорин/гранзим Б-зависимого механизма; при этом грануло-зависимый и  $\text{TNF}\alpha/\text{TNF-R1}$ -зависимый сигнальные пути вносят наибольший вклад в цитотоксический потенциал ИФН-ДК;

**предложена** оригинальная научная гипотеза о селективном ( $\text{TNF}\alpha/\text{TNF-R1}$ -опосредованном) дефекте цитотоксической функции ДК у пациентов с глиобластомой и его патогенетической значимости при опухолевом росте;

**доказано**, что дефект  $\text{TNF}\alpha$ -опосредованного механизма цитотоксичности ИФН-ДК обусловлен низкой экспрессией мембранной формы  $\text{TNF}\alpha$  в результате снижения экспрессии гена *TNF $\alpha$*  и возрастания экспрессии и активности  $\text{TNF}\alpha$ -конвертирующего фермента;

**сформулированы** новые представления о негативном влиянии опухоли на дифференцировку и  $\text{TNF}\alpha$ -опосредованную цитотоксичность ДК;

**доказана** возможность использования экзогенного интерлейкина 2 и внеклеточной двуцепочечной ДНК человека в качестве активаторов  $\text{TNF}\alpha$ -медируемой цитотоксической активности ИФН-ДК больных глиобластомой против аутологичных опухолевых клеток.

**Теоретическая значимость исследования обоснована следующими положениями:**

**доказана** способность дендритных клеток, генерируемых в присутствии интерферона-альфа, индуцировать гибель глиобластомных клеток, что расширяет знания о функции ДК как клеток-эффекторов врожденного иммунитета;

**применительно к проблематике диссертации результативно использован** комплекс современных иммунологических и молекулярно-генетических методов исследования, включающих культивирование различных типов клеток, многоцветную проточную цитофлуорометрию, МТТ-тест, метод иммуноферментного анализа, метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени, спектрофлуориметрический метод;



**изложены** результаты экспериментальных исследований, доказывающие вовлечение различных проапоптогенных молекул в реализацию цитотоксического эффекта ДК против клеток глиобластомных линий;

**доказана** чувствительность большинства глиобластомных линий к цитотоксическому действию ДК, опосредованному через  $\text{TNF}\alpha/\text{TNF-R1}$ -сигнальный путь, а также нарушение этого механизма у пациентов с глиобластомой;

**раскрыты** причины нарушения  $\text{TNF}\alpha$ -опосредованной цитотоксичности ИФН-ДК у больных глиобластомой;

**показана** значимость мембранной формы  $\text{TNF}\alpha$  в реализации цитотоксической активности ИФН-ДК;

**установлено** разнонаправленное влияние растворимых факторов, продуцируемых клетками глиобластомы, на  $\text{TNF}\alpha$ -зависимую цитотоксическую активность ИФН-ДК.

**Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:**

**определены** новые молекулярные мишени (мембранная форма  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{TNF}\alpha$ -конвертирующий фермент) для разработки новых терапевтических подходов, направленных на элиминацию опухолевых клеток у пациентов со злокачественными глиомами головного мозга;

**представлены** результаты, которые определяют перспективы практического применения ДК в иммунотерапии глиобластомы путем усиления цитотоксической активности ИФН-ДК с помощью рекомбинантного интерлейкина 2 или внеклеточной двуцепочечной ДНК человека.

**Оценка достоверности результатов исследования выявила:**

результаты получены на сертифицированном оборудовании и с использованием сертифицированных реагентов, работа выполнена на высоком методическом уровне, достаточна по объему материала. Теория построена на доказанных и проверяемых фактах, согласуется с опубликованными экспериментальными данными по теме диссертации. Идеи базируются на обобщении литературных данных, а также анализе результатов, полученных в

репрезентативном количестве наблюдений. Достоверность результатов определяется методически правильно построенным ходом исследования, использованы современные и адекватные методики сбора и статистической обработки исходной информации. Выводы основаны на фактических данных, вытекают из сути работы и отражают ее содержание.

**Личный вклад соискателя состоит** в ключевой роли в постановке задач, выборе методов исследования, разработке методик и гипотез, в непосредственном участии на всех этапах получения исходных данных и научных экспериментах (выделение моноклеарных клеток из проб периферической крови условно-здоровых доноров и больных злокачественными глиомами, генерация ДК, получение и ведение опухолевых линий, цитотоксический тест, цитофлуориметрический и спектрофлуориметрический анализы, иммуноферментный анализ, ПЦР), систематизации и обобщении экспериментальных данных, анализе литературных источников, интерпретации и статистической обработке полученных результатов. Подбор больных на базе клиники нейрохирургии ФГБУ «Новосибирский НИИ травматологии и ортопедии» Минздрава РФ осуществлялся сотрудниками отделения нейрохирургии, зав. отделением д.м.н. В.В.Ступак, и на базе нейрохирургического отделения №4 (онкологическое) Федерального нейрохирургического центра Минздрава РФ (г. Новосибирск), зав. отделением к.м.н. А.В. Калиновский. Патоморфологический и иммуногистохимический анализ образцов опухоли пациентов, включенных в исследование, выполнен сотрудниками Регионального центра высоких медицинских технологий (г. Новосибирск). Подготовка основных публикаций по выполненной работе проведена лично автором или при его непосредственном участии.

Диссертация Тыриновой Тамары Викторовны «Цитотоксическая активность дендритных клеток против клеток глиобластомы: медиаторы, механизмы регуляции и возможности направленной коррекции» является самостоятельной законченной научной квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований сформулированы теоретические положения и решена важная в научном и практическом отношениях задача по



исследованию тумороцидной активности интерферон альфа-индуцированных дендритных клеток против клеток глиобластомы и механизмов регуляции этой активности, подтверждена возможность разработки новых терапевтических подходов на основе дендритных клеток в иммунотерапии онкологических заболеваний. По актуальности избранной темы, методическому уровню, 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).

На заседании 22 октября 2019 года диссертационный совет принял решение присудить Тыриновой Т.В. ученую степень доктора биологических наук по специальности 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 16 человек, из них 8 докторов наук по специальности 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология, участвовавших в заседании, из 21 человека, входящих в состав совета, проголосовали: за присуждение учёной степени - 16, против присуждения учёной степени - 0, недействительных бюллетеней - 0.

Председатель диссертационного совета

д-р мед. наук, профессор, академик РАН

Козлов В.А.

и.о. ученого секретаря диссертационного совета

д-р мед. наук

Колесникова О.П.



22 октября 2019 года