

ОТЗЫВ ОППОНЕНТА

на диссертацию Табакова Дмитрия Вячеславовича «Фенотипическая гетерогенность эффекторных клеток онкологических больных», представленную на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.01.12 – онкология

Актуальность темы

Доказано, что появление и развитие онкологического заболевания происходит в результате нарушения активности эффекторного звена иммунитета, играющего основную роль в противоопухолевой защите организма, или полного его угнетения. Присутствие нарушений функционального состояния иммунной системы отмечено у большинства онкологических больных. В структуру эффекторного звена входят НК-клетки, цитотоксические Т-лимфоциты (ЦТЛ) и НКТ-клетки. Общей чертой, позволяющей объединить данные популяции в одну группу, является способность к противоопухолевому ответу за счет цитотоксического действия на опухолевые клетки. Киллинг злокачественных клеток осуществляется за счет разных механизмов: за счет апоптоза, выделения перфорина и гранзимов или посредством действия ряда цитокинов.

Методом оценки состояния иммунной системы онкологических больных служит субпопуляционный анализ иммунокомпетентных клеток (ИКК), основанный на изучении экспрессии поверхностных антигенов и внутриклеточных структур, позволяющих также оценить функциональную активность ИКК. Данные о популяционной структуре иммунной системы также необходимы для поиска прогностических маркеров, коррелирующих с эффективностью проводимой терапии и течением заболевания, и служит для персонализации лечения онкологического больного. Кроме того, с их помощью представляется возможным определить механизмы генерации противоопухолевого иммунного ответа и их направление. В настоящее время с развитием иммунотерапии, мониторинг иммунологических показателей является необходимой составляющей этого вида лечения с целью назначения

индивидуальных подходов к назначению иммуномодулирующих средств и check-point блокаторов, а также служит для коррекции проводимой терапии.

Метод проточной цитометрии, позволяющий оценить субпопуляционную структуру эффекторного звена иммунитета, основан на регистрации флюоресценции меченых антител, специфически связанных с дифференцировочными антигенами лимфоцитов. Поскольку для определения субпопуляционной принадлежности лимфоцитов зачастую недостаточно окрашивания одним специфическим маркером, на сегодняшний день используют 2, 3- и 4-цветное окрашивание различными комбинациями антител и разными флуоресцентными метками. Такое многоцветное окрашивание позволяет одновременно оценить содержание и функциональную активность субпопуляций клеток эффекторного звена и проводить дифференциальную диагностику патологических состояний. Для иммунофенотипирования эффекторных клеток это имеет большое значение, так как поверхностный антиген CD8 не является строго специфичным для клеток этого звена иммунитета. Он характерен не только для цитотоксических Т-лимфоцитов, но также и для Т-лимфоцитов с супрессорной активностью, НК- и НКТ-клеток, макрофагов, тучных клеток и др. При этом, для идентификации НК и НКТ-лимфоцитов необходима оценка коэкспрессии целого ряда антигенов.

Кроме того, было установлено, что функциональная активность эффекторных клеток зависит от степени экспрессии белка CD8 на мембране, присутствия или отсутствия ко-стимулирующих, адгезивных молекул и многих других факторов. В зависимости от плотности антигена популяциям иммунокомпетентных клеток присущи либо супрессорные, либо эффекторные функции, что позволяет определять соотношение регуляторных и эффекторных клеток иммунной системы. Роль нарушения субпопуляционного баланса иммунных клеток описана для многих заболеваний, в том числе и онкологических, кроме того, он позволяет судить об эффективности противоопухолевого ответа, осуществляемого иммунной системой.

Целью настоящего исследования является выявление фенотипической гетерогенности, опосредующей функциональную активность эффекторных клеток у здоровых доноров и онкологических больных.

В связи с вышеизложенным, диссертационная работа Табакова Дмитрия Вячеславовича «Фенотипическая гетерогенность эффекторных клеток онкологических больных» является своевременной и актуальной.

Научная новизна

В работе впервые подробно описана фенотипическая гетерогенность популяций эффекторного звена иммунной системы, обуславливающая различную функциональную активность лимфоцитов. В исследовании выявлен субпопуляционный баланс эффекторных иммунокомпетентных клеток у здоровых доноров и онкологических больных различных стадий заболевания и нозологических форм. Установлены закономерности строения эффекторного звена иммунитета в зависимости от уровня CD8-положительных лимфоцитов и стадии опухолевого роста. Данные, полученные в результате исследования являются основой для дальнейшего изучения противоопухолевого ответа иммунной системы и популяций Т-, NK- и NKT-лимфоцитов в норме и при онкологических заболеваниях.

Научно-практическая значимость

Установленные закономерности строения субпопуляционного баланса эффекторных клеток и особенностей функциональной активности лимфоцитов позволяют установить направление развития иммунного ответа при различных нозологиях и стадиях онкологических заболеваний. Показаны различия строения эффекторного звена иммунной системы онкологических больных и доноров, а также пациентов с различными нозологическими формами опухолей. Подход, применяемый в работе позволяет одновременно оценить состояние эффекторного звена иммунной системы индивидуального онкологического больного, что может служить для коррекции и персонализации противоопухолевой терапии. Выявление баланса субпопуляций эффекторных и регуляторных иммунокомпетентных клеток в сочетании с

клинико-патологическими данными может служить для выявления прогностических факторов клинического течения заболевания.

Общая характеристика диссертационной работы

Диссертация написана по традиционному плану и включает главы: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение собственных исследований», «Заключение», «Выводы» и «Список литературы». Диссертационная работа изложена на 138 страницах машинописного текста, иллюстрирована 13 таблицами, и 12 рисунками. Список использованных литературных источников состоит из 254 работ, из них 240 иностранных авторов и 14 отечественных.

В разделе «**Введение**» автор указывает на актуальность исследования, обозначает цель работы и конкретные задачи, необходимые для ее достижения. В данной главе описана научная новизна и практической значимости работы, сформулированы основные положения, выносимые на защиту.

«**Обзор литературы**» изложен на 32 страницах и состоит из трех подглав. Раздел посвящен описанию основных популяций эффекторного звена иммунной системы, их функции и роли в генерации противоопухолевого иммунного ответа. В главе «Натуральные киллеры» представлена характеристика данной популяции, описаны механизмы противоопухолевой цитотоксичности НК-лимфоцитов, приведены доказательства прогностического значения изменений содержания данной субпопуляции. Раздел «Т-лимфоциты» содержит информацию о специфическом иммунном ответе, осуществляемого цитотоксическими Т-клетками и механизмах его супрессии опухоли. Описана роль специфического иммунного ответа при онкологических заболеваниях и их терапии. Затем, автор описывает характеристики и двойственную роль НКТ-лимфоцитов в одноименном разделе.

Изложенный в обзоре материал подтверждает компетентность автора в изучаемом вопросе, указывает на актуальность проблемы и поставленных автором задач.

В главе «**Материалы и методы**» описаны используемые материалы (моноклональные антитела, флуоресцентные красители, реагенты для проведения реакции иммунофлуоресценции), представлена характеристика доноров и больных, чьи образцы периферической крови были использованы в исследовании. Подробно описаны метод проточной цитометрии и прямой реакции иммунофлуоресценции, особенности гейтирования и DotPlot анализа. Описаны использованные методы статистической обработки материала.

Глава «**Результаты собственных исследований и их обсуждение**» изложена на 31 странице, состоит из 6 подразделов:

У здоровых лиц и онкологических больных оценено процентное содержание CD8, CD3+CD8+, CD3-CD8+ - клеток. Установлено, что при оценке общих групп количества CD8-положительных клеток и основных популяций эффекторных клеток у онкологических больных находятся в диапазоне донорских значений при широком диапазоне значений у отдельных больных. Этот факт свидетельствует о том, что необходим индивидуальный подход к анализу каждого пациента. Выявлено, что CD3+CD8+ ЦТЛ составляют большинство эффекторных клеток доноров и онкологических больных (>43,3%). Исключение составляли больные раком яичников, у которых основной популяцией ЭК являются НК-лимфоциты (43,5%).

Так как у онкологических больных по экспрессии CD8 наблюдался широкий диапазон значений (от 7% до 60% лимфоцитов), пациенты были отнесены к трем группам: с высокими значениями CD8(>35%), нормальными (25-35%) и низкими (<25%). Большинство пациентов оказалось с повышенным количеством CD8+ клеток (>43,8%). Наименьшими были подгруппы с низкими значениями CD8.

В работе установлено, что у онкологических больных различных нозологических форм значения CD3-CD56+CD16+ и CD3+CD16+CD56+ лимфоцитов соответствуют донорским уровням. Исключение составляют больные раком яичников, у которых увеличено содержание CD3-CD56+CD16+

НК-лимфоцитов, и больные раком молочной железы, где происходит увеличение доли популяции CD3⁺CD16⁺CD56⁺ NKT-клеток.

Показана коэкспрессия маркеров CD8, CD16 и CD3 на НК- и NKT-лимфоцитах. Натуральные киллеры экспрессируют CD16 преимущественно в средней и низкой плотности и характеризуются фенотипом CD45⁺CD3⁻CD8^{low}CD16^{low}. NKT-лимфоциты в основном экспрессируют CD8 в высокой степени и обладают фенотипом CD45⁺CD3⁻CD8^{high}CD16^{low}. У онкологических больных с высоким уровнем CD8-положительных клеток повышено число НК-и/или CD3⁺CD8^{high}CD16^{low} NKT-клеток (до 20% CD3⁺ лимфоцитов), что объясняет увеличение количества CD8⁺CD16⁺ лимфоцитов в данной подгруппе.

У доноров значения CD16⁺ и CD8⁺ перфорин-позитивных клеток составили 16,8 (13; 21,7)% и 14,8 (9,6; 19,8)% соответственно. Характерной особенностью онкологических больных является наличие перфорин-содержащей популяции CD8^{low} лимфоцитов (7,7 (5,4; 12)%), отсутствующей у здоровых лиц. Выявлена зависимость числа перфорин-содержащих CD8⁺ клеток от содержания CD8-положительных лимфоцитов в периферической крови пациентов. Установлено, что у онкологических больных преобладает рецепторно-независимый механизм цитотоксичности, что отражается в повышении числа CD8^{high}Perforin⁺ ЦТЛ.

Содержание перфорина в НК-лимфоцитах соответствует показателям здоровых лиц и не зависит от нозологической формы и содержания CD8-положительных клеток.

Выявлено, что ЦТЛ являются основной популяцией эффекторных клеток доноров и онкологических больных. Исключением являются больные раком яичников, где зафиксировано преобладание НК-лимфоцитов. При анализе групп пациентов с разным содержанием CD8-положительных лимфоцитов было установлена зависимость субпопуляционного баланса эффекторных клеток от содержания CD8-положительных клеток. Так, у онкологических больных с высоким уровнем CD8-клеток увеличено число ЦТЛ и NKT-лимфоцитов по сравнению с показателями здоровых лиц, у больных с

нормальным и пониженным уровнем CD8⁺ лимфоцитов медиана количества ЦТЛ находится ниже донорского уровня. Количество НКТ-клеток снижено в группе больных с низкими уровнями CD8-положительных клеток. При этом количество НК практически не изменяется и находится в диапазоне значений нормы.

В главе «**Заключение**» автор подводит итог исследования, представляя материал в сжатой, лаконичной форме и подчеркивая соединение отдельных частей диссертации в единое целое с хорошо прослеживающейся логикой рассуждений. В заключении полученные данные сравниваются с зарубежными и отечественными источниками. Приводятся рассуждения и предположения о значении установленных закономерностей субпопуляционного баланса эффекторных клеток и их фенотипической гетерогенности.

«**Выводы**» работы обоснованы, вытекают из приведенных в диссертации результатов и соответствуют положениям, вынесенным на защиту.

Работа выполнена на самом современном методическом уровне, объем проведенных исследований достаточен, методы статистической обработки материала соответствуют поставленным задачам, таким образом, достоверность полученных результатов не вызывает сомнения.

Основные материалы диссертационной работы отражены в 3 печатных работах, из них 3 в изданиях, рекомендованных перечнем ВАК МОН РФ для публикации материалов докторских и кандидатских диссертаций.

Автореферат полностью отражает содержание диссертационной работы.

Замечания. Принципиальных замечаний к работе нет.

Заключение

Диссертация Табакова Дмитрия Вячеславовича «Фенотипическая гетерогенность эффекторных клеток онкологических больных» является законченной научно-квалификационной работой, содержащей решение актуальной научной задачи — выявление фенотипической гетерогенности, опосредующую функциональную активность эффекторных клеток у здоровых доноров и онкологических больных.

Таким образом, диссертационная работа Табакова Дмитрия Вячеславовича полностью соответствует требованиям п.9 «Положения о присуждения учёных степеней» Постановления Правительства РФ от 24.09.2013 №842 в редакции постановления Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 года № 335 и от 02 августа 2016 года №748, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.01.12 онкология.

Официальный оппонент,

Заведующий отделом №90

Иммунодиагностики и иммунокоррекции

ФГБУ «ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА»,

доктор медицинских наук,

профессор



Пинегин Б.В.

115478, г.Москва, Каширское шоссе, дом 24, 8(499)618-04-64

Подпись *Александр Б.В.*
ЗАВЕРЯЮ
Учёный секретарь ФГБУ
"ГНЦ Институт иммунологии"
ФМБА России
Александр Васова А.
18 " апреля 2018 г.