

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО 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

Эффекторное звено иммунитета играет основную роль в противоопухолевой защите организма. К нему относятся НК-клетки цитотоксические Т-лимфоциты (ЦТЛ) и НКТ-клетки, осуществляющие цитотоксическое действие на опухоль за счет разных механизмов (напрямую за счет апоптоза, выделения перфорина и гранзимов или посредством действия цитокинов). Доказано, что появление и развитие онкологического заболевания происходит за счет снижения активности этого звена иммунитета или полного его подавления. Наличие нарушений в структуре и функциональном состоянии иммунной системы присутствует у большинства онкологических больных. Для оценки состояния иммунной системы онкологических больных с солидными опухолями применяется субпопуляционный анализ иммунокомпетентных клеток (ИКК) методом проточной цитометрии. Его основой служит изучение экспрессии поверхностных антигенов и внутриклеточных структур и анализ функциональной активности ИКК. Данный анализ также позволяет определить механизмы генерации противоопухолевого иммунного ответа, необходим для поиска прогностических маркеров, коррелирующих с эффективностью проводимой терапии и течением заболевания, и служит для персонализации лечения онкологического больного. Мониторинг иммунологических показателей является обязательной составляющей иммунотерапии с целью разработки индивидуальных подходов к назначению блокаторов контрольных точек иммунитета и также служит для коррекции проводимой терапии.

Субпопуляционный анализ эффекторного звена иммунитета проводится методом проточной цитометрии с использованием антител к специфическим

дифференциальным антигенам лимфоцитов. На сегодняшний день для иммунофенотипирования лимфоцитов используют 2, 3- и 4-цветное окрашивание комбинациями антигенных специфичности и разными флуоресцентными метками, позволяющее одновременно оценивать содержание функциональную активность субпопуляций клеток эффекторного звена и проводить дифференциальную диагностику патологических состояний. Необходимо отметить, что поверхность клеток иммунитета обусловлена тем, что поверхностный антиген CD8 не является строго специфичным для цитотоксических Т-лимфоцитов и экспрессируется также на Т-лимфоцитах с супрессорной активностью, NK- и NKТ-клетках, макрофагах, тучных клетках и др. При этом, для идентификации NK и NKТ-лимфоцитов не существует единственного белка, характерного для каждой популяции, и их фенотипирование осуществляется при анализе коэкспрессии нескольких антигенов.

Также обнаружено, что функциональная активность клеток зависит от количества белка (степени экспрессии) на мембране, присутствия на поверхности лимфоцитов ко-стимулирующих, адгезивных молекул и многих других факторов. Каждой супрессорной или эффекторной популяции CD8-положительных клеток характерна определенная степень экспрессии каждого антигена. Таким образом, по определению плотности антигенов на мембране можно судить о субпопуляционном балансе между регуляторными и эффекторными популяциями иммунной системы, нарушение которого происходит при многих заболеваниях, в том числе онкологических. По содержанию эффекторных популяций и их функциональной активности можно судить об эффективности противоопухолевого ответа, осуществляемого иммунной системой.

Целью настоящего исследования является выявление фенотипической гетерогенности, опосредуемой 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 подробно охарактеризован субпопуляционный баланс эффекторных иммунокомпетентных клеток у здоровых доноров и онкологических больных, описаны различия строения эффекторного звена у больных разных нозологических форм и стадий опухолевого роста. Впервые подробно одновременно изучена фенотипическая и функциональная гетерогенность основных популяций эффекторных лимфоцитов. Данная работа может являться основой для дальнейших исследований генерации противоопухолевого ответа иммунной системы и популяций Т-, НК- и НКТ-лимфоцитов в норме и при онкологических заболеваниях.

Научно-практическая значимость

Полученные результаты исследования субпопуляционного баланса популяций эффекторных клеток и особенностей их функциональной активности позволяют обобщить данные исследований по каждой отдельной популяции и установить направление развития иммунного ответа при различных нозологиях и стадиях онкологических заболеваний. Описаны различия эффекторного звена иммунной системы как между онкологическими заболеваниями и донорами, так и между различными нозологическими формами опухолей. Выявление соотношений субпопуляций иммунокомпетентных клеток, контролирующих процессы активации и супрессии, в сочетании с клинико-патологическими данными послужит основой для определения прогностических факторов клинического течения заболевания и противоопухолевого контроля 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». Список использованных литературных источников состоит из 254 работ, из них 240 иностранных авторов и 14 отечественных. Диссертационная работа изложена на 138 страницах машинописного текста, иллюстрирована 13 таблицами, и 12 рисунками.

«Введение» посвящено актуальности и новизне данной работы, поставлена цель и конкретные задачи, необходимые для ее достижения. Представлена информация о научной новизне и практической значимости работы, сформулированы основные положения, выносимые на защиту.

Глава **«Обзор литературы»** написана на 32 страницах и состоит из трех подглав, представляющие характеристику и описание основных популяций эффекторного звена иммунной системы и их роль в противоопухолевом иммунном ответе. В разделе «Натуральные киллеры» автор подробно останавливается на механизмах противоопухолевой активности НК-лимфоцитов и прогностическом значении изменения содержания данной субпопуляции. Далее, в разделе «Т-лимфоциты», Д.В. Табаков переходит к описанию специфического иммунного противоопухолевого ответа, осуществляемого цитотоксическими Т-клетками, механизмам его подавления опухолью, роли 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»** представлена характеристика используемого материала (МКА, флуоресцентные красители, реагенты для проведения реакции иммунофлуоресценции) доноров и больных, чьи образцы крови были проанализированы в работе. Подробно описан метод проточной цитометрии и окрашивание клеток с помощью метода прямой реакции иммунофлуоресценции. Описаны использованные методы статистической обработки материала.

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

Поставлены и решены следующие задачи:

1. Изучить субпопуляционное соотношение $CD45^+$ лимфоидных клеток с высокой и низкой плотностью поверхностного антигена CD8 у здоровых доноров и онкологических больных.

С помощью метода проточной цитометрии у доноров было оценено процентное содержание CD8, $CD3^+CD8^+$, $CD3^-CD8^+$ - клеток. Выявлено, что количество CD8-положительных клеток у онкологических больных находится в диапазоне донорских значений. При анализе популяции $CD3^+CD8^+$ ЦТЛ было выявлено, что они представляют собой основную массу эффекторных клеток доноров и онкологических больных. Статистически значимое различие было выявлено у больных раком яичников, где преобладали NK-лимфоциты.

При этом был выявлен широкий диапазон значений экспрессии CD8 у онкологических больных (от 7% до 60% лимфоцитов). Были отобраны и проанализированы подгруппы с высокими значениями $CD8(>35\%)$, нормальными (25-35%) и низкими ($<25\%$). Во всех нозологических формах большинство пациентов оказалось с повышенным количеством $CD8^+$ клеток. Наименьшими были подгруппы с низкими значениями CD8.

Таким образом, было показано, что необходим индивидуальный подход к анализу каждого пациента, так как в общей группе значения основных субпопуляций близки к донорским и не отображают реальной картины субпопуляционного баланса эффекторных клеток.

2. Изучить субпопуляционное соотношение $CD45^+$ лимфоидных клеток с высокой и низкой плотностью поверхностного антигена CD16 у здоровых доноров и онкологических больных.

Были оценены субпопуляции $CD3^-CD56^+CD16^+$ и $CD3^+CD16^+CD56^+$. Показано, что при различных нозологических формах значения данных групп клеток соответствуют донорским уровням. Статистически значимое увеличение

содержания $CD3^+CD56^+CD16^+$ NK-лимфоцитов выявлено у больных раком яичников, $CD3^+CD16^+CD56^+$ NKT-клеток у больных раком молочной железы.

3. Определить коэкспрессию CD8, CD16 и CD3 на лимфоидных $CD45^+$ клетках у здоровых доноров и онкологических больных.

При анализе коэкспрессии данных маркеров было показано, что NK-лимфоциты обладают преимущественно средней и низкой плотностью антигена CD16 и характеризуются фенотипом $CD45^+CD3^+CD8^{low}CD16^{low}$. NKT-лимфоциты в основном обладают фенотипом $CD45^+CD3^+CD8^{high}CD16^{low}$. Выявлено, что у онкологических больных всех нозологических форм с высокими уровнями маркера CD8 повышено число $CD8^+CD16^+$ клеток за счет увеличения содержания NK- и/или $CD3^+CD8^{high}CD16^{low}$ NKT-клеток (до 20% $CD3^+$ лимфоцитов).

4. Изучить цитотоксический потенциал эффекторных лимфоцитов с различной плотностью поверхностных антигенов CD8 и CD16 по оценке уровня внутриклеточного перфорина у доноров и онкологических больных.

У онкологических больных во всех подгруппах количество $CD16^+Perforin^+$ клеток соответствовало содержанию $CD3^+CD16^+CD56^+$ NK-клеток. Данные автора позволяют сделать вывод, что содержание перфорина в NK-лимфоцитах практически не меняются у онкологических больных по сравнению с донорами.

При анализе количеств $CD8^+Perforin^+$ клеток были продемонстрированы особенности, характерные для онкологических больных. У онкологических больных выявлено наличие перфорин-содержащей популяции $CD8^{low}$ лимфоцитов (7,7 (5,4; 12)%), отсутствующей у здоровых лиц. Выявлено, что снижение содержания CD8-положительных лимфоцитов сопровождается уменьшением количества перфорин-содержащих $CD8^+$ лимфоцитов в подгруппах с различным содержанием CD8. Установлено, что у онкологических больных увеличена доля $CD8^{high}Perforin^+$ ЦТЛ, что свидетельствует о переключении механизма цитотоксичности с рецепторно-опосредованного на рецепторно-независимый.

5. Выявить особенности популяционной и субпопуляционной структуры эффекторных клеток у онкологических больных различных нозологических форм (рак яичников, рак молочной железы, рак слизистой оболочки полости рта, меланома).

Показано, что ЦТЛ представляют собой основную массу эффекторных клеток доноров и онкологических больных. Статистически значимое различие было выявлено у больных раком яичников, где преобладали NK-лимфоциты. При анализе групп пациентов с разным содержанием CD8-положительных лимфоцитов было установлено, что у онкологических больных с высоким уровнем CD8-клеток характерно повышение медианы значений ЦТЛ и NKT-лимфоцитов по сравнению с показателями здоровых лиц. Для онкологических больных с нормальным уровнем CD8⁺ лимфоцитов характерно снижение медианы количества ЦТЛ. Количество NK и NKT-лимфоцитов соответствует показателям здоровых лиц. Для онкологических больных с пониженным уровнем CD8⁺ клеток показано резкое уменьшение медианы количества ЦТЛ. Количество NK-клеток в данной группе соответствует показателям здоровых доноров (число NKT-лимфоцитов снижено).

«Заключение» подводит итог значительной по объему проделанной работы, представляя материал в сжатой, лаконичной форме и подчеркивая соединение отдельных частей диссертации в единое целое с хорошо прослеживающейся логикой рассуждений. В заключении приведено сравнение полученных данных с результатами зарубежных исследователей, сделаны предположения о значении выявленных особенностях субпопуляционного баланса эффекторных клеток и их фенотипической гетерогенности.

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

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

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,
Заведующая лабораторией

иммунологии, онкоцитологии и клеточных технологий в онкологии
научно-исследовательского отдела молекулярной биологии
и экспериментальной терапии опухолей

ФГБУ "РНЦРР" Минздрава России, к.м.н.

117997, Москва, ул. Профсоюзная, д.86, +7 (499) 120-65-10

Кулинич Т.М.

08.05.2019

Подпись к.м.н. Кулинич Т.М. заверяю

Ученый секретарь

ФГБУ "РНЦРР" Минздрава России,

Доктор медицинских наук, профессор



Цаллагова З.С.