

ОТЗЫВ официального оппонента

на диссертацию на соискание учёной степени

кандидата биологических наук Атретханы Камар-Сулу Нияз Кызы

на тему: «Иммунорегуляторные функции TNF в поддержании супрессорного микроокружения при аутоиммунных и раковых заболеваниях»

по специальности 03.03.03 - «иммунология»

Актуальность темы диссертации

Иммунотерапия онкологических заболеваний – активно развивающаяся область прикладной науки. На сегодняшний день проводится более 1500 клинических исследований в этой области. Давно известно, что опухоли способны ускользать от иммунитета посредством различных механизмов, однако только сравнительно недавно показано, что опухолевые клетки способствуют образованию и накоплению в кровеносных органах и вокруг себя особой популяции – миелоидных супрессорных клеток (MDSCs). Они включают в себя миелоидные предшественники различной степени зрелости и характеризуются коэкспрессией моноцитарных и гранулоцитарных поверхностных маркеров CD11b и Gr-1, соответственно. Эти клетки способны ингибировать адаптивный иммунитет – подавлять пролиферацию эффекторных Т-клеток, вызывать их анергию, ингибировать миграцию, а также ингибировать дифференцировку NK-клеток и, наоборот, способствовать экспансии Т-регуляторных клеток. Было показано, что фактор некроза опухолей (TNF) способствует накоплению MDSCs при ряде онкологических заболеваний. Однако молекулярные и клеточные механизмы действия TNF на MDSCs и лимфоциты остаются недостаточно изученными, а роль TNF в развитии рака остается неоднозначной. Кроме того, известно, что TNF – цитокин широкого спектра действия, и через взаимодействие с TNFR2 может играть защитную роль при нейровоспалении, участвовать в процессах ремиелинизации за счет стимулирования пролиферации предшественников олигодендроцитов и ингибировать цитотоксические Т-клетки при

аутоиммунных заболеваниях. Роль TNF и молекулярные механизмы его действия при этих состояниях сегодня также активно изучаются. Особенно интересна роль TNF-TNFR2 сигнального пути в T-регуляторных клетках. В свете вышесказанного, работа Атретханы Камар-Сулу Нияз Кызы несомненно актуальна для современной иммунологии, поскольку посвящена изучению роли TNF в поддержании супрессорного микроокружения при раковых и аутоиммунных заболеваниях. В работе подробно изучаются последствия блокировки сигнала от TNF на рост опухоли фибросаркомы MCA205 и на накопление MDSCs, а также исследуется роль TNFR2 в T-регуляторных клетках при экспериментальном аутоиммунном энцефаломиелите, мышинной модели рассеянного склероза.

Степень обоснованности научных положений и выводов

Основные научные положения и выводы, сформулированные в работе, обоснованы и логично следуют из тех результатов, которые были получены автором в ходе выполнения работы. Выводы соответствуют поставленным задачам. Все задачи, поставленные автором, выполнены, и цель работы достигнута – изучена роль TNF и его рецептора TNFR2 в поддержании супрессорного микроокружения при раковых заболеваниях на примере фибросаркомы MCA205 и при аутоиммунных заболеваниях на модели экспериментального аутоиммунного энцефаломиелите у мышей. В работе применяются самые современные методы иммунологии, клеточной биологии, генной инженерии и молекулярной биологии. Достаточно упомянуть, что работа выполнена на уникальных мышинных линиях, гуманизированных по гену *TNF* и с двойной гуманизацией системы *TNF-TNFR2*. В диссертации также применяется кондиционный нокаут *TNFR2* в T-регуляторных клетках.

Достоверность и новизна результатов и выводов диссертационной работы

Достоверность результатов и выводов диссертационной работы обусловлена репрезентативностью экспериментальных групп, использованием современных методов исследования, наличием необходимых контрольных групп, количественным сравнением показателей, адекватными методами статистической обработки данных. Достоверность выявленных закономерностей и различий между экспериментальными группами не вызывает сомнений. Автор работы, владея широким спектром биологических методов исследования, является хорошо подготовленным и высококвалифицированным специалистом.

Работу проводили на уникальной линии мышей, гуманизированных по гену *TNF*, на которой было изучено действие клинически применяемых блокаторов TNF в модели перевиваемой солидной опухоли MCA205 фибросаркомы. Впервые было исследовано, как нейтрализация TNF *in vivo* с помощью Инфликсимаба и Этанерцепта влияет на накопление MDSC и их функциональную активность при росте фибросаркомы MCA205. Было показано, что нейтрализация TNF обоими типами блокаторов приводит к замедлению роста опухоли и подавляет накопление MDSC в крови и в лимфоидных органах. При этом блокировка TNF не только способствует снижению количества MDSC, но также нарушает их супрессорные функции и приводит к увеличению количества цитотоксических Т-клеток в лимфоидных органах.

В работе впервые охарактеризованы мыши с двойной гуманизацией системы лиганд-рецептор TNF-TNFR2 с возможностью генетической инактивации TNFR2 в Т-регуляторных клетках (Treg). Установлено, что TNFR2 участвует в поддержании супрессорного фенотипа Treg. Удаление TNFR2 приводит к снижению экспрессии ключевых молекул Treg, участвующих в подавлении аутоиммунных реакций. Кроме того, была установлена протективная роль TNFR2 на Treg клетках в контроле нейровоспаления в мышечной модели рассеянного склероза.

Автореферат и опубликованные работы полностью отражают основные положения диссертации. Результаты диссертационной работы были представлены и обсуждены на международных и отечественных конференциях и научных школах. По теме диссертации опубликовано 11 печатных работ: 4 статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus, RSCI и рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 03.03.03 – иммунология, а также 7 тезисов.

Теоретическая и практическая значимость полученных результатов

Представленные результаты работы имеют большое значение для фундаментальной иммунологии и для клинических приложений. Прежде всего, иммунотерапия, в том числе и антицитокиновая терапия, представляет собой новую эру в разработке лекарственных средств для аутоиммунных и раковых заболеваний. Однако для создания безопасных и эффективных прототипов антицитокиновых препаратов необходимо понимание молекулярных механизмов регуляции иммунного ответа, а также изучение роли ключевых цитокинов и их рецепторов в поддержании гомеостаза организма.

В работе были использованы гуманизированные по гену *TNF* мыши, которые позволили продемонстрировать эффективность действия клинически применяемых блокаторов TNF человека в мышинной модели фибросаркомы. Кроме того, была подтверждена важность TNF в поддержании супрессорных свойств MDSC, и впервые показана эффективность нейтрализации hTNF в подавлении MDSC *in vivo*. Данные, представленные в работе свидетельствуют о том, что TNF и MDSC могут рассматриваться как потенциальные мишени для иммунотерапии рака.

Используя мышей с кондиционным удалением TNFR2 с Treg клеток, была установлена важная иммунорегуляторная роль TNFR2 в поддержании их супрессорного фенотипа. Кроме того, полученные данные о протективной

роли TNF/TNFR2 на Treg клетках при нейровоспалении указывают на перспективность создания более специфических реагентов, которые будут ингибировать действие цитокина только из патогенного источника, при этом сохраняя его иммунорегуляторные свойства.

Содержание диссертации

Изложение научно-квалификационной работы построено по стандартному плану и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов, обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, который включает 139 источников. Работа изложена на 99 страницах, содержит 31 рисунок, 2 таблицы, 1 приложение из 7 рисунков. Библиографический список содержит ссылки на 139 литературных источников. Литературные данные и результаты экспериментальных исследований структурированы, подразделы отражают фактический ход исследования и логически связаны друг с другом.

В обзоре литературы описываются сигнальный путь TNF, физиологические функции TNF, его роль в развитии рака и аутоиммунных заболеваний. Наглядно и ясно представлен сигнальный путь TNF через TNFR1 и TNFR2. Описываются существующие на сегодняшний день ингибиторы TNF. Приводится подробное описание популяции MDSC и их функций. Описываются свойства Treg клеток и особенности сигнального пути TNF в них. Обзор литературы достаточно полон, но не избыточен.

В разделе материалы и методы приводится характеристика использованных линий мышей, излагаются основные методы исследования и представлен дизайн экспериментов. Несколько огорчает, что этот раздел представлен всего 6 страницами и не всегда приводятся подробные описания методик. Это порождает ряд вопросов к интерпретации результатов. Так, например, не совсем ясно как определяли количество MDSC в лимфоидных органах? В рисунке указано количество MDSCs, но, скорее всего,

представлена концентрация этих клеток? Также из описания методов неясно, какова была эффективность кондиционного нокаута TNFR2 в Treg клетках.

В главе «Результаты» автор приводит основные результаты своей работы, которые излагаются последовательно и логично следуют один за другим. В первой части работы показано, что введение блокаторов TNF приводило к пониженному накоплению MDSCs в организме мыши и снижению их супрессорных функций, увеличению цитотоксических Т-клеток в лимфоидных органах.

На мой взгляд, интересным результатом является то, что при блокировке TNF «количество» (концентрация?) MDSCs в лимфоидных органах падает значительно, чем их доля от CD11b⁺ клеток. Это свидетельствует о том, что и количество всех CD45⁺B220⁻F4/80⁻CD11b⁺ клеток падает в лимфоидных органах к 20 дню после введения опухоли MCA205. Может ли это означать, что моноциты/макрофаги мигрируют из лимфоидных органов, скажем, в область опухоли? Не представлялось ли автору интересным исследовать MDSCs, инфильтрирующие опухоль? Может быть, блокирование TNF приводит не к снижению их накопления, а к перераспределению их местоположения? Интересно также отметить, что автором были обнаружены отличия в действии Инфликсимаба и Этанерцепта на MDSC. Остается открытым вопрос о том, прямое воздействие оказывает TNF на MDSCs или опосредованное.

Во второй части работы было показано, что TNFR2-зависимый сигнальный каскад играет важную роль в поддержании супрессорного фенотипа Treg клеток в норме и при нейровоспалении. Было экспериментально продемонстрировано, что мыши с гуманизацией гена *TNF* могут иметь нарушенный TNF/TNFR2 сигнальный путь, критичный для контроля нейровоспаления, но не опухолевого роста. Далее, используя мышей с возможностью кондиционного нокаута TNFR2, было показано, что TNFR2 на Treg клетках необходим для поддержания их супрессорного фенотипа. При этом генетическая инактивация TNFR2 на Treg клетках

приводила к снижению экспрессии ключевых супрессорных молекул, что было сопряжено с подавлением их супрессорных функций. Более того, установлено, что TNFR2 на Treg клетках играет протективную роль при нейровоспалении. Так, TNFR2 на Treg клетках необходим для поддержания их супрессорного фенотипа, доли CCR6+ популяции Treg клеток, мигрирующих в ЦНС, а также для контроля Th17-зависимого иммунного ответа при экспериментальном энцефаломиелите.

К работе есть несколько вопросов.

Поскольку MDSCs представлены предшественниками гранулоцитов/моноцитов, кажется, что они должны осуществлять свое влияние локально в месте опухоли. В работе выделяли MDSCs не из области опухоли, а из селезенки/лимфоузлов/периферической крови. Чем это мотивируется?

В первой части работы изучали содержание MDSCs в периферической крови у мышей дикого типа и в мышах, гуманизированных по гену *TNF*. В обоих случаях количество MDSC увеличивалось за 18 дней до 10% без всякого введения опухолевых клеток. С чем это связывает автор?

Интересные данные представлены на рис. 25. Автор показывает, что удаление TNFR2 в Treg клетках приводит к накоплению FoxP3+ в лимфатических узлах и в селезенке. При этом доля всех исследованных субпопуляций FoxP3+ (CTLA4+, GITR+ и CCR6+) не изменяется, или даже уменьшается. При этом экспрессия всех этих молекул на Treg падает. Напрашивается вопрос, какая из субпопуляций FoxP3 клеток накапливается и в чём может заключаться её роль?

Та же самая картина наблюдается в ЦНС на фоне индукции EAE у $hTNFKI \times hTNFR2KI^{\text{deltaTreg}}$: % FoxP3+CD4+ клеток не изменяется по сравнению с контролем, а субпопуляции CD25+, CTLA4+, GITR+, CCR6+ снижаются. Снова возникает вопрос – какая субпопуляция FoxP3+CD4+

увеличивает свое присутствие в ЦНС и какова её возможная роль в аутоиммунном энцефаломиелите?

В тексте встречаются неточности в подписях к рисункам (например, к рисунку 14).

Почему автор во второй части работы сконцентрировал усилия на CD4+ Т-хелперах, а не на CD8+ цитотоксических лимфоцитах?

Заключение

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 03.03.03 – «иммунология» (по биологическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова, а также оформлена, согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Атретханы Камар-Сулу Нияз Кызы заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.03 – «иммунология».

Официальный оппонент:

доктор биологических наук,
старший научный сотрудник
лаборатории физиологии кроветворения
ФГБУ «НМИЦ гематологии Минздрава России»

Бигильдеев Алексей Евгеньевич

15.10.2019

Контактные данные:

тел.:

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация:

14.01.21 – гематология и переливание крови

Адрес места работы:

125167, Москва, Новый Зыковский пр., д. 4,

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный
медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства
здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НМИЦ гематологии»
Минздрава России), лаборатория физиологии кроветворения.

Тел.: +7(495)6124252; e-mail: director@blood.ru

Подпись сотрудника

ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России

Бигильдеева А.Е. удостоверяю:

Ученый секретарь

ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, к.м.н.

Джулакян У.Н.



15.10.2019