

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук, профессора Чердынцевой Надежды Викторовны на диссертацию Куликовой Екатерины Владимировны «Индукция противоопухолевого иммунного ответа *in vitro* дендритными клетками, трансфицированными полиэпитопными ДНК-конструкциями», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.03.09 – «клиническая иммунология, аллергология»

Актуальность исследования

В настоящее время рост числа больных злокачественными и низкая эффективность традиционных методов лечения делают актуальной проблему терапии онкологических заболеваний не только в России, но и во всем мире. Исследованиями последних десятилетий показано, что при колоректальном раке, как и при других злокачественных новообразованиях, не происходит формирования протективного противоопухолевого иммунного ответа за счет недостаточной иммуногенности опухолевых клеток, способности опухоли вызывать местную или системную иммунодепрессию, снижения активности Т-лимфоцитов, нарушения механизма представления опухоль-ассоциированных антигенов. На сегодняшний день наиболее перспективным из разрабатываемых подходов в лечении онкологических заболеваний является селективная активация Т-клеточного противоопухолевого иммунного ответа с помощью иммунокомпетентных клеток, при этом ключевая роль отводится антигенпрезентирующим клеткам, в частности, дендритным клеткам. Известно, что дендритные клетки, инкубированные с антигенами опухоли, способны генерировать формирование сильного специфического иммунного ответа, как против имеющихся опухолей, так и против опухолевых клеток, вторично введенных в организм животного. До сих пор дендритные клетки чаще стимулировали лизатом опухолевых клеток, либо отдельными пептидами и белками. Однако недостатком такого подхода является недостаточная клиническая эффективность, обусловленная гетерогенностью и неизученностью антигенного состава опухолевых клеток. Недавно появился новый подход к вакцинам с использованием генов, кодирующих опухоль-ассоциированные антигены. Дендритные клетки подвергают трансфекции, в результате которой они становятся способными продуцировать и представлять в комплексе с МНС опухолевые антигены. Генетическим материалом в таких онковакцинах может выступать либо РНК, либо ДНК, кодирующие полные опухоль-ассоциированные антигены или выбранные эпитопы, что позволяет получать наиболее специфичную иммуностимуляцию и делает

процесс более стандартизованным. До настоящего времени полиэпитопные ДНК-конструкции для активации противоопухолевого иммунного ответа при колоректальном раке не разрабатывались и не исследовались, что делает это направление актуальным и перспективным.

Таким образом, сформулированная цель работы – изучить эффективность индукции клеточного цитотоксического иммунного ответа в культуре мононуклеарных клеток больных колоректальным раком с помощью дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкциями, кодирующими эпитопы опухоль-ассоциированных антигенов – в полной мере определяют теоретическую и научно-практическую значимость работы.

Степень обоснованности научных положений и выводов

Диссертационная работа изложена на 105 страницах машинописного текста. Структура представленной диссертации традиционна и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследований, главы, содержащей результаты собственных исследований, обсуждения полученных данных, заключения и выводов. Основные главы выдержаны по объему и пропорциям. Иллюстративный материал представлен 14 рисунками и 3 таблицами.

Обзор литературы посвящен детальной характеристике механизмов противоопухолевого иммунного ответа и их нарушений, роли дендритных клеток в противоопухолевом иммунитете, в частности, при колоректальном раке, обсуждению способов доставки различных видов антигенов в дендритные клетки для индукции специфического противоопухолевого иммунного ответа при колоректальном раке. Проанализированы их преимущества и недостатки, дана характеристика опухоль-ассоциированных антигенов колоректального рака. Проведенный анализ подчеркивает актуальность выбранного направления работы, раздел хорошо написан и отражает суть решаемой автором задачи. Представлены сведения из 196 литературных источников, из которых подавляющее большинство составляют зарубежные публикации (184 источника). Поставленные в работе задачи решены адекватно с помощью различных современных методов иммунологии, молекулярной биологии, онкологии, использование которых позволило получить достоверные экспериментальные данные. Дизайн работы обозначен четко и последовательно, в соответствии с задачами. В исследование включены 49 пациентов с колоректальным раком I-IV стадий, у которых были получены дендритные клетки как исследовательский объект, но деления на группы по стадиям процесса не производилось. Однако при этом возникает вопрос, есть ли различия в функциональных свойствах дендритных клеток и эффективности их трансфекции в зависимости от стадии

Приоритетность разработок автора подтверждается полученным патентом на способ применения оригинальной плазмиды для стимуляции специфического иммунного ответа на опухолевые клетки. Полученные в исследовании результаты опубликованы в журналах, входящих в список ВАК, в том числе в импактном зарубежном журнале, неоднократно представлялись и обсуждались на конференциях российского и международного уровня.

Теоретическая значимость работы

Использование дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкцией, кодирующей иммуногенные эпитопы опухоль-ассоциированных антигенов СЕА, ЕрСАМ и MUC4 является эффективным способом стимуляции цитотоксического потенциала мононуклеарных клеток. Полученные данные указывают на то, что уровень стимуляции мононуклеарных клеток зрелыми дендритными клетками, трансфицированными ДНК-конструкциями, зависит от вида сигнальной последовательности в составе плазмидной конструкции. В частности, использование ДНК-конструкции, кодирующей последовательность убиквитина, оказалось более эффективным в плане активации противоопухолевой цитотоксичности мононуклеаров, чем при трансфекции генетического материала, кодирующего последовательность легкой каппа-цепи иммуноглобулинов. Такие результаты свидетельствуют о различных механизмах влияния данных сигнальных последовательностей на процессинг и презентацию выбранных эпитопов.

Практическая значимость работы

В ходе выполнения Куликовой Е.В. диссертационной работы был обоснован способ модуляции клеточного иммунного ответа в культуре мононуклеарных клеток, который может быть основой новой альтернативной клеточной технологии лечения колоректального рака. Отработанный протокол послужил основой для полученного патента на изобретение № 2507265 «Рекомбинантная плазмидная ДНК pCI-UB-POLYEP1, содержащая эпитопы опухоль-ассоциированных антигенов для колоректального рака, и способ ее применения для стимуляции специфического противоопухолевого иммунного ответа против клеток колоректального рака».

Принципиальных замечаний по работе нет.

Вопросы

1. Есть ли различия в функциональных свойствах дендритных клеток, эффективности их трансфекции и индукции иммунного ответа против опухоли в зависимости от стадии опухолевого процесса при колоректальном раке у пациентов, из крови которых были получены дендритные клетки.

Заключение

Представленная к защите диссертационная работа Куликовой Екатерины Владимировны является законченным научно-квалификационным исследованием, содержащим решение актуальной задачи – разработан способ индукции противоопухолевого цитотоксического иммунного ответа с помощью генерированных из клеток периферической крови больных колоректальным раком дендритных клеток, трансфицированных полиэпитопными ДНК-конструкциями. По актуальности поставленных задач, методическому уровню исследований, новизне и значимости полученных результатов диссертационная работа Куликовой Екатерины Владимировны «Индукция противоопухолевого иммунного ответа *in vitro* дендритными клетками, трансфицированными полиэпитопными ДНК-конструкциями», выполненная под руководством доктора медицинских наук, профессора Сенникова С.В., соответствует требованиям, предъявляемым к работам на соискание ученой степени кандидата наук (п. 9 «положения о порядке присуждения ученых степеней»; Постановление Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842), а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.03.09 – «клиническая иммунология, аллергология».

Официальный оппонент,
доктор биологических наук, профессор,
заместитель директора по научной работе,
заведующий лабораторией молекулярной
онкологии и иммунологии Федерального
государственного бюджетного научного
учреждения «Томский научно-исследовательский
институт онкологии»

Адрес: 634050, г.Томск, пер.Кооперативный, 5,

Н.В.Чердынцева
(диссертация на соискание
ученой степени доктора
биологических наук по
специальности 14.03.03 –
Патологическая физиология)

Тел. (3822)51-25-29, E-mail: nvch@oncology.tomsk.ru

Сайт: <http://www.oncology.tomsk.ru/>

Подпись профессора Чердынцевой Н.В.

Заверяю:

Ученый секретарь, к.м.н.



Н.Д.Киселева