

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА
на диссертационную работу Калининой Анастасии Андреевны
«Гемопоэтические, иммуномодулирующие и противоопухолевые свойства
рекомбинантного циклофилина А человека»,
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 14.01.12 - онкология

Актуальность исследования

Классические методы лечения онкологических заболеваний - химио- и радиотерапия - сопряжены с тяжелыми побочными эффектами, наиболее серьезными из которых является миелосупрессия. Применение традиционных ростовых факторов для восстановления нормального гемопоэза онкологических больных имеет ряд ограничений, поэтому в настоящее время большой практический интерес представляет поиск новых подходов для нейтрализации побочных эффектов классической терапии онкологических заболеваний.

Кроме того, сегодня в онкологическую практику активно внедряются методы иммунотерапии. Поиск факторов стимуляции собственной иммунной системы организма, коррекции иммунного ответа у онкологических больных, а также разработка подходов комбинированной иммунотерапии являются перспективной областью исследований в онкологии.

Диссертационная работа А.А. Калининой посвящена изучению гемопоэтических, иммуномодулирующих и противоопухолевых свойств рекомбинантного циклофилина А человека (рЧЦфА).

На основании проведенных ранее исследований, показавших способность ЦфА индуцировать хемотаксис незрелых гемопоэтических клеток, автор сделал предположение о возможной роли данного белка в регенерации кроветворной и иммунной систем организма после воздействия цитостатиков или облучения. Кроме того, исходя из описанных в литературе функций ЦфА как провоспалительного фактора, обладающего хемоатрактивными свойствами по отношению к зрелым клеткам врожденного и адаптивного иммунитета, а также

способностью регуляции других провоспалительных цитокинов, было сделано предположение о наличии у ЦфА выраженных иммуномодулирующих свойств. Таким образом, актуальность изучения ЦфА как фактора гемопоэза, иммуномодуляции и противоопухолевой защиты организма не вызывает сомнений

Научная новизна

Научная новизна диссертационной работы также не вызывает сомнений. В рамках проведенных исследований впервые описаны иммуномодулирующие свойства рчЦфА, который является фактором активации и пролиферации В-клеток и усиливает гуморальный иммунный ответ. РчЦфА участвует в костимуляции, а также регуляции пролиферации активированных Т-клеток и принимает участие в контроле их функциональной активности. Таким образом, полученные данные имеют важное значение для понимания фундаментальных механизмов реализации адаптивного иммунного ответа. Впервые показана способность рчЦфА участвовать в восстановлении кроветворной и иммунной систем организма после воздействия высоких доз цитостатика (5-фторурацила, 5-ФУ) и облучения. Кроме того, выявлена и изучена противоопухолевая и антиметастатическая активность рчЦфА в моделях перевиваемых опухолей. Впервые в системе *in vivo* показана способность рчЦфА усиливать противоопухолевые эффекты 5-ФУ и нейтрализовать лейкопению у животных - опухоленосителей, вызванную его воздействием. Для более детального изучения взаимодействия нативного ЦфА и стволовых клеток на разных этапах жизни организма автором разработана уникальная модель трансгенных мышей с индуцируемой гиперэкспрессией ЦфА в остеобластах. Данная модель позволит детально изучить роль ЦфА как фактора микроокружения гемопоэтических стволовых клеток и его участие в формировании кроветворной и иммунной систем организма в процессе онтогенеза. В работе впервые показано и изучено эмбриотокическое действие высоких доз нативного ЦфА мыши и рчЦфА.

Полученные в данной диссертационной работе результаты значительно расширяют представления о функциональной активности ЦфА, что имеет не только важное фундаментальное значение, но и открывает широкие перспективы для применения данного белка в клинической практике. Автор полагает, что результаты проведенных исследований дают основания для дальнейшего изучения рчЦфА и разработки лекарственных средств на его основе для поддерживающей терапии заболеваний, сопровождающихся лейкопенией; в качестве иммуномодулятора для коррекции иммунодефицитных состояний; в качестве самостоятельного противоопухолевого агента или в составе комбинированной лекарственной терапии онкологических заболеваний.

Степень обоснованности и достоверность научных положений, выводов и рекомендаций

Научные положения и практические рекомендации, сформулированные автором в диссертации, основаны на тщательном изучении научной литературы, а также анализе большого объема экспериментального материала, который обеспечивает достоверность результатов исследования и сформулированных выводов. В работе использованы современные методы исследования, полностью соответствующие поставленным задачам. Статистический анализ проведен с использованием адекватных методов. Положения, выносимые на защиту, основаны на анализе полученных результатов и соответствуют цели и задачам исследования. Выводы аргументированы, обоснованы и вытекают из проведенных автором исследований и представленных результатов.

Общая характеристика работы

Диссертационная работа написана по традиционной форме, изложена на 194 страницах, состоит из введения, обзора литературы, глав «Материалы и методы», «Результаты исследования» и «Обсуждение результатов», заключения, выводов, списка сокращений и списка цитируемой литературы, включающего ссылки на

187 отечественных и зарубежных источников, и содержит 87 иллюстраций и 32 таблицы.

Во введении приведено обоснование выбора темы и подробно освещена актуальность проведенных исследований, представлены цель и задачи, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, методология и методы исследования. Приведены положения, выносимые на защиту, степень достоверности и аprobация результатов.

Обзор литературы представляет собой тщательный анализ имеющихся данных о структуре и функциях ЦфА. В данном разделе подробно описана роль ЦфА в патогенезе различных заболеваний (сердечно-сосудистых, воспалительных, онкологических и др.), а также освещены строение и функции молекулы CD147 - основного рецептора ЦфА, посредством взаимодействия с которым реализуется большинство функций исследуемого белка. В заключении данного раздела подчеркнуто, что на сегодняшний день основная масса работ посвящена изучению ЦфА как фактора патогенности при различных заболеваниях, но существует явная недостаточность информации о функциях ЦфА в норме и указывается перспективность исследования роли данного белка в функционировании и регуляции иммунной системы организма.

Собственные исследования автора изложены в разделах «Материалы и методы», «Результаты исследования» и «Обсуждение результатов».

Раздел «Материалы и методы» состоит из 31 подраздела, в которых подробно описаны используемые животные, реактивы и опухолевые штаммы. Детально описан метод получения рчЦфА, а также методы воздействия (облучение, обработка 5-ФУ и/или рчЦфА) и схемы экспериментов. В данном разделе тщательно изложены методы клеточной и молекулярной биологии, а также различные функциональные системы *in vitro* и *in vivo*. Стоит отметить широкий спектр используемых методов, что указывает на высокий методический уровень работы и высокую квалификацию диссертанта. Методы статистического анализа адекватны и позволяют сделать обоснованные выводы.

В разделе «Результаты исследования» изложены собственные результаты проведенных исследований, которые разделены на пять подразделов, соответствующих поставленным цели и задачам. В первом подразделе представлены результаты изучения влияния рчЦфА на гомеостаз кроветворной и иммунной систем интактного организма. Показано, что курсовое введение рчЦфА не вызывает изменений в субпопуляционном составе клеток костного мозга, а также относительном количестве и фенотипе Т - лимфоцитов периферической крови. Между тем, выявлена способность рчЦфА индуцировать активацию В-клеток периферической крови интактных животных. В этом же подразделе изучено воздействие рчЦфА на процессы восстановления кроветворной и иммунной систем организма после сублетального облучения и воздействия химиопрепарата (5-ФУ). Результаты экспериментов показали, что рчЦфА оказывает умеренное стимулирующее воздействие на процессы восстановления гранулоцитопоэза и В-лимфопоэза в периферических органах сублетально облученных животных (кровь, селезенка и др.), что, однако, не сопровождается опустошением и субпопуляционными перестройками костного мозга. Показано, что введение рчЦфА на фоне воздействия 5-ФУ стимулирует полное восстановление лейкоцитов крови 3 к дню, препятствует развитию лейкопении в селезенке и стимулирует полное восстановление клеточности костного мозга через 7 дней после введения цитостатика. Кроме того, выявлена роль рчЦфА в регенерации тимуса животных после облучения и воздействия цитостатика, что может указывать на потенциальную роль ЦфА в формировании и функционировании тимуса и развитии Т-лимфоцитов.

Второй подраздел «Результатов исследования» посвящен изучению влияния рчЦфА на развитие иммунного ответа (гуморального и клеточного) у интактных животных и животных со вторичным иммунодефицитом. Показано, что курсовое введение рчЦфА интактным животным индуцирует неспецифическую активацию Т- и В- лимфоцитов, повышая их чувствительность к дополнительным активационным стимулам. Проведенные исследования продемонстрировали иммуномодулирующие свойства рчЦфА как фактора активации В-клеток,

усиливающего их пролиферацию и гуморальный иммунный ответ. Кроме того, было показано, что рчЦфА является ко-стимулятором активированных Т-клеток, осуществляющим, однако, и регуляторную функцию и подавляющим пролиферацию лимфоцитов при их избыточной активации. При изучении влияния рчЦфА на восстановление иммунной системы организма после различных доз облучения, включая сублетальное, было показано, что курсовое введение данного белка не приводит к стабильному восстановлению функциональной активности иммунной системы в течение первых трех недель после облучения. Однако, курсовое введение рчЦфА на фоне воздействия 5-ФУ предотвращало ингибицию клеточного иммунного ответа в реакции ГЗТ, способствуя его поддержанию на уровне интактных животных.

Третий подраздел «Результатов исследования» включает в себя изучение противоопухолевой активности рчЦфА. Эксперименты проводили с использованием четырех видов перевиваемых опухолей различного гистогенеза и оценивали влияние разных схем введения рчЦфА на их рост *in vivo*. Был выявлен ярко выраженный противоопухолевый эффект исследуемого белка в отношении всех используемых опухолевых штаммов. На модели перевиваемого рака шейки матки показано, что введение рчЦфА значительно подавляло рост как развивающегося, так и уже сформированного опухолевого узла. В этой экспериментальной модели выявлено, что противоопухолевое действие рчЦфА сопоставимо с эффектами 5-ФУ, и показано аддитивное действие этих веществ при терапии развивающегося опухолевого узла. Кроме того, подтверждена способность рчЦфА восстанавливать гемопоэз при химиотерапии, что проявилось в предотвращении развития 5-ФУ -индуцированной лейкопении в крови мышей с привитым раком шейки матки. На модели постоперационного метастазирования рака легкого Льюис показана способность рчЦфА подавлять образование метастазов на ранних этапах развития данной опухоли. При изучении возможного механизма противоопухолевого действия рчЦфА в модели меланомы B16 в системе *in vivo* была выявлена способность данного белка модулировать экспрессию генов матриксных металлопротеиназ, которые могут проявлять

противоопухолевую активность на разных стадиях канцерогенеза, а также отсутствие влияния рчЦфА на ангиогенез данной опухоли. При более детальном исследовании механизма противоопухолевого действия рчЦфА была изучена его роль в развитии иммунного ответа на аллогенную опухоль у мышей дикого типа и трансгенных мышей с ограниченным репертуаром Т-клеточных рецепторов. Данное исследование показало, что рчЦфА способен стимулировать элиминацию опухолевых клеток за счет индукции раннего накопления зрелых гранулоцитов и эффекторных цитотоксических Т-лимфоцитов, усиливая уровень специфического иммунного ответа у иммунодефицитных животных. Полученные в диссертационной работе результаты позволили автору предположить, что ЦфА может являться фактором противоопухолевой защиты организма в норме.

В четвертом подразделе «Результатов исследования» описана работа по созданию экспериментальной трансгенной модели для изучения роли ЦфА как фактора микроокружения гемопоэтических стволовых клеток. Однако в ходе работы было выявлено эмбриотокическое действие высоких концентраций ЦфА при его конститтивной гиперэкспрессии, вследствие чего получение жизнеспособных трансгенных мышей оказалось невозможным. По этой причине была создана линия мышей Cyp-STOP, у которых экспрессия гена мЦфА предотвращалась Cre-регулируемой СТОП-кассетой. Для получения целевых трансгенных животных проводили скрещивания мышей линии Cyp-STOP с мышами линии Osx-Cre с тетрациклин - зависимой экспрессией Cre-рекомбиназы. Таким образом, автором разработана уникальная модель кондиционных трансгенных мышей, с помощью которой появилась возможность проведения исследований роли нативного ЦфА в формировании гемопоэтической системы организма.

В заключительном подразделе «Результатов исследования» проведено изучение влияния высоких доз рчЦфА на формирование и развитие плода, которое подтвердило эмбриотокическое действие данного белка, выявленное ранее. Тератогенные эффекты ЦфА ранее не были показаны и представляют большой интерес как для фундаментальных исследований эмбриогенеза, так и

для оценки возможности практического использования лекарственных средств на основе данного белка.

В разделе «Обсуждение результатов» проведен детальный анализ полученных собственных результатов, а также их сравнение с современными литературными данными. В заключении кратко обобщены все результаты исследований. Практические рекомендации даны на основании результатов проведенных исследований.

Выводы диссертации соответствуют поставленным задачам, обоснованы и подтверждены фактическим материалом исследований.

Личный вклад автора в разработку научной проблемы и проведение исследований в рамках данной диссертационной работы не вызывает сомнений. Всего по теме диссертации опубликовано 3 научных статьи и 12 тезисов в материалах научных конференций. Среди опубликованных статей 2 – в отечественных и 1 – в зарубежном журнале, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ для публикации результатов диссертационных исследований. Кроме того, по теме диссертации получено 3 патента Российской Федерации на изобретение.

По диссертации имеются некоторые замечания:

В тексте диссертации встречаются некоторые неточные формулировки. Например, на стр. 94 диссертации указано, что «Внесение в культуру митогенной дозы КонА (4,0 мкг/мл) привело к подавлению пролиферации спленоцитов мышей, обработанных рЧЦфА (рис. 44).» В действительности, как видно из рис. 44, КонА вызывал некоторую пролиферацию, которая у спленоцитов мышей после обработки рЧЦфА была ниже, чем у интактных мышей. На мой взгляд следовало написать «Индекс стимуляции спленоцитов мышей под действием митогенной дозы КонА (4,0 мкг/мл) снижался после обработки мышей рЧЦфА.»

На рис. 1 автореферата приведены данные по количеству активированных В-клеток, которое было отнесено к общему числу лимфоцитов крови. Наряду с активационным маркером CD69 автор определял количество В-лимфоцитов по

маркеру В220. В этом случае более логичным было бы отнести количество активированных В-клеток к количеству общих В-лимфоцитов.

На стр 11 автореферата указано, что «Анализ развития иммунного ответа *in vivo* показал, что курсовое введение рЧЦФА приводит к усилению гуморального иммунного ответа (рис. 3А), что может быть обусловлено рЧЦФА - индуцированной активацией В-клеток.» Полученные результаты можно объяснить как непосредственным влиянием циклофилина на активацию В-лимфоцитов, так и опосредованным действием через Т хелперы.

Высказанные замечания не затрагивают полученных результатов и сущности сделанных выводов, а также не влияют на общую положительную оценку рассматриваемой диссертации.

Заключение

Таким образом, диссертационная работа А.А. Калининой «Гемопоэтические, иммуномодулирующие и противоопухолевые свойства рекомбинантного циклофилина А человека» является законченной научно-квалификационной работой, выполненной под руководством доктора биологических наук, профессора Казанского Дмитрия Борисовича, содержащей новые решения актуальных научных задач для онкологии по поиску факторов противоопухолевой защиты организма, а также подходов, направленных на предотвращение побочных эффектов химио- и радиотерапии.

По своей актуальности, методическому уровню, объему проведенных исследований, научной новизне и значимости диссертационная работа А.А. Калининой «Гемопоэтические, иммуномодулирующие и противоопухолевые свойства рекомбинантного циклофилина А человека», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.01.12 – онкология, полностью соответствует всем требованиям «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24 сентября 2013 г. (в редакции постановлений Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 г. № 335, от 02 августа

2016 г. № 748, от 29 мая 2017 г. № 650, от 28 августа 2017 г. № 1024 и от 01 октября 2018 г. № 1168) "О внесении изменений в Положение о присуждении ученых степеней", предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а её автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 14.01.12 – онкология.

Заведующий лабораторией №23 иммунохимии
Федерального государственного бюджетного учреждения
«Государственный научный центр «Институт иммунологии»
Федерального медико-биологического агентства России»,
доктор биологических наук (14.00.36 Аллергология и иммунология),

профессор

Филатов Александр Васильевич

Филатов

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства России», 115522, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24. Телефон: 8 (499) 311-67-78. E-mail: info@nrcii.ru.

