Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Федеральный исследовательский центр
Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения
Российской академии наук»
630090, г.Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, д.10

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Сунбули Хетам «Характеризация опухоль-ассоциированных нейтрофилов и особенности их взаимодействия с опухолевыми клетками», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – молекулярная биология

Актуальность проведенного исследования.

В настоящее время нейтрофилы рассматриваются не только как ключевые клетки врожденного иммунитета, но и как важные участники опухолевого процесса. Недавние исследования показали гетерогенность популяции нейтрофилов при развитии опухолей. Эта гетерогенность объясняет, почему в одних типах опухолей повышение общего и относительного количества нейтрофилов по сравнению с лимфоцитами связано с благоприятным прогнозом, тогда как в других — с неблагоприятным. Неоднозначная роль нейтрофилов в патогенезе опухолей открывает новые возможности для терапии, поскольку они могут влиять на эффективность различных методов лечения. Для разработки новых терапевтических подходов с использованием активации противоопухолевых нейтрофилов необходимы знания о механизмах переключения нейтрофилов в про- или противоопухолевые фенотипы при опухолях различного происхождения. Результаты исследования, проведенного Сунбули Хетам, вносят значительный вклад в понимание пластичности нейтрофилов при опухолевом процессе, что имеет важное значение для развития новых подходов для иммунотерапии онкологических заболеваний.

Структура диссертационной работы. Диссертация Сунбули Хетам имеет традиционную структуру, состоит из Введения, Обзора литературы, Материалов и методов, Результатов и обсуждения, Выводов, Приложения и Списка цитируемой литературы. В списке литературы представлено 384 источника. Текст занимает 144 страницы, включает 21 рисунок и 13 таблиц.

В разделе «**Введение**» автор определяет актуальность темы, формулирует главную цель и задачи работы, научную новизну и практическую значимость исследования. В этом разделе также представлена методология и применяемые методы исследования. Раздел «**Введение**» содержит положения, выносимые на защиту, данные об апробации работы и личном вкладе автора.

Раздел «**Обзор литературы**» всесторонне охватывает тему исследования и включает сведения, подчеркивающие её актуальность. В первой главе **Обзора** рассматриваются общие характеристики и функции нейтрофилов. Во второй главе представлены основные

этапы изучения опухоль-ассоциированных нейтрофилов в историческом развитии до современных представлений об их гетерогенности, классификации, их активности в отношении опухолевых клеток. Подробно описываются нейтрофильные внеклеточные ловушки (NET), история их изучения и роль в формировании микроокружения опухоли. В заключительном разделе рассматриваются новые терапевтические подходы к лечению рака, особое внимание уделяется вопросам привлечения нейтрофилов в микроокружение опухоли, модуляции их фенотипа и перспективам использования NET как терапевтической мишени. Обзор дает полное представление о современных концепциях в области исследования, а также о вопросах, которые требуют дальнейшего изучения.

В главе «**Экспериментальная часть**» подробно описаны используемые реактивы, препараты, буферные растворы, оборудование и программное обеспечение. Представлен перечень праймеров для проведения ПЦР, описаны использованные в работе клеточные культуры и лабораторные животные. Детально описаны методы выделения нейтрофилов мыши, проточной цитометрии, визуализации NET с помощью конфокальной микроскопии, а также оценка продукции реактивных форм кислорода (ROS) в нейтрофилах. Представлены методы проведения экспериментов как на клеточных культурах (*in vitro*), так и на лабораторных животных (*in vivo*), включая процедуры прививания опухолей и последующего изучения полученных биологических образцов.

Полученные в ходе работы Сунбули Хетам экспериментальные данные подробно описаны в главе «**Результаты и обсуждение**», состоящей из шести основных разделов.

В первом разделе автор проводит тщательное исследование и оптимизацию протоколов выделения нейтрофилов из костного мозга и селезенки мышей. Представлена сравнительная характеристика нейтрофилов, выделенных разными методами, с анализом обогащения полученных популяций нейтрофилами, жизнеспособности и общего выхода клеток, а также оценкой их функциональной активности. Автор заключает, что метод иммуномагнитной положительной селекции является эффективным и оправданным подходом для выделения наиболее обогащенной нейтрофилами и жизнеспособной популяции клеток из селезёнки мышей.

При разработке методической базы настоящей работы проведен выбор стабильных референсных генов, необходимых для анализа фенотипа нейтрофилов мыши методом RT-qPCR, проанализирован профиль экспрессии и стабильности экспрессии генов в нейтрофилах с учетом различных активационных состояний. В качестве стабильно экспрессируемых референсных генов для нейтрофилов мыши были выбраны *Tbp* и *Hprt1*.

Особое внимание было уделено анализу фенотипа нейтрофилов селезенки у мышей с различными типами опухолей (LLC, RLS_{40}, B16), который показал влияние типа опухоли на характеристики нейтрофилов, что говорит об их пластичности в условиях формирования опухолевого микроокружения.

Следующий раздел посвящен изучению фенотипа нейтрофилов при подавлении роста опухолей и метастазов под действием ДНКазы I у мышей с опухолями RLS_{40} и B16. Рассмотрено влияние препарата на рост опухолей и концентрацию циркулирующей внеклеточной ДНК в сыворотке крови, а также морфофункциональные изменения в иммунокомпетентных органах. Проведен анализ изменения фенотипа нейтрофилов селезенки после введения ДНКазы I мышам с опухолью.

В представленной работе исследована способность опухоль-ассоциированных нейтрофилов к формированию NET. Интересные результаты получены при изучении способности нейтрофилов, выделенных из мышей, получавших ДНКазу I, к выбросу NET. Обнаружена тенденция к снижению способности нейтрофилов к выбросу NET в результате введения препарата, что является важным признаком смещения поляризации нейтрофилов в противоопухолевый фенотип.

В заключительном разделе проведена поляризация выделенных нейтрофилов в противоопухолевый фенотип *in vitro*, и установлено их цитотоксическое воздействие на клетки меланомы B16 при совместном культивировании, что подчеркивает потенциальную роль нейтрофилов в противоопухолевой иммунной реакции. Каждый из шести разделов сопровождается обсуждением, которое интегрирует экспериментальные данные в контекст современных представлений о роли нейтрофилов в развитии опухолей.

Результаты, полученные автором работы, вносят значительный вклад в понимание причин гетерогенности нейтрофилов, механизмов влияния ДНКазы I на фенотип нейтрофилов и развитие опухоли, что важно для выбора направления дальнейших исследований и разработки новых терапевтических подходов.

Достоверность результатов и обоснованность выводов.

Достоверность результатов определяется применением различных современных методик и большим объёмом данных, полученных при выполнении нескольких биологических повторений с дальнейшим статистическим анализом. Сделанные выводы являются обоснованными, так как опираются на широкий спектр экспериментальных данных, представленных в диссертации. Материалы диссертации отражены в 3-х печатных работах, которые опубликованы в рецензируемых журналах, индексируемых в базах

данных Web of Science и Scopus. Во всех статьях по теме диссертации Сунбули Хетам является первым автором.

Научная новизна и значимость работы. В работе Сунбули Хетам впервые предложены стабильно-экспрессируемые референсные гены *Tbp* и *Hprt1* для оценки экспрессии генов в нейтрофилах мыши методом RT-qPCR. Описан фенотип опухоль-ассоциированных нейтрофилов в селезенке мышей на различных опухолевых моделях, и выявлена их способность к формированию NET. Установлена связь между фенотипом нейтрофилов и размером опухоли: при больших опухолях доминирует проопухолевый иммуносупрессивный профиль, тогда как при замедленном росте опухоли — противоопухолевый. Показано, что введение бычьей панкреатической ДНКазы I мышам с опухолью значительно изменяет фенотип нейтрофилов в сторону противоопухолевого фенотипа. Интересным наблюдением является то, что ДНКаза I, помимо разрушения NET, подавляет способность опухоль-ассоциированных нейтрофилов к образованию NET.

Полученные результаты расширяют понимание роли нейтрофилов в опухолевом микроокружении и открывают перспективы для использования препаратов ДНКазы I как одного из средств иммуностимулирующей противоопухолевой терапии. Полученные результаты также расширяют представления о возможностях модуляции фенотипа нейтрофилов для создания новых терапевтических стратегий.

Замечания и предложения.

Диссертационная работа Сунбули Хетам четко структурирована, написана хорошим литературным языком, содержит незначительное количество опечаток и неудачных выражений.

Поскольку в работе Сунбули Хетам получены результаты, которые говорят о возможности разработки новых стратегий лечения некоторых типов опухолей, возникают вопросы о направлениях таких разработок.

В частности, впервые выявлены стабильно экспрессированные про-опухолевые маркеры нейтрофилов селезенки мышей с опухолями. Автор предполагает, что эти маркеры можно адаптировать для анализа нейтрофилов человека при прогнозировании течения болезни, и даже как мишени для терапии. Каким образом это предполагается сделать?

Также интересно узнать мнение автора о том, каким образом новые данные о механизме действия ДНКазы I на фенотип нейтрофилов помогут скорректировать подходы к лечению ряда опухолей с использованием препаратов на основе этого фермента.

Изучение свойств опухоль-ассоциированных нейтрофилов интенсивно развивается, одновременно происходит исследование аналогичных характеристик опухоль-ассоциированных макрофагов. Существуют ли данные об их аддитивном участии в патогенезе опухоли? Каково мнение автора о перспективах изучения взаимного влияния клеток врожденного иммунного ответа в патогенезе опухолей?

Заключение. Диссертационная работа Сунбули Хетам «Характеризация опухоль-ассоциированных нейтрофилов и особенности их взаимодействия с опухолевыми клетками», представленная к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – молекулярная биология, представляет собой полноценное завершенное научное исследование, в котором успешно решена важная задача, имеющая как научно-практическое, так и фундаментальное значение и способствующая расширению общего понимания роли и гетерогенности нейтрофилов в процессе развития опухоли, а также их интеграции в подходы к терапии онкологических заболеваний.

Диссертационная работа Сунбули Хетам полностью соответствует требованиям пп. 2.1–2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, а её автор, Сунбули Хетам, заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – молекулярная биология.

Официальный оппонент:
Рыкова Елена Юрьевна,
доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории регуляции экспрессии генов Федерального исследовательского центра Института цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук

_____ Рыкова Елена Юрьевна
«8» декабря 2025 г.

Адрес: 630090, г. Новосибирск, проспект Академика Лаврентьева, д. 10
Телефон: +7(383) 363-49-80, Факс: +7(383) 333-12-78, email: rykova.elena.2014@gmail.com

Подпись Рыковой Елены Юрьевны заверяю:
кандидат биологических наук,
ученый секретарь ИЦиГ СО РАН /Орлова Г.В./