

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 темы исследования.

Клетки иммунной системы при онкопатологии находятся в диалоге с опухолевыми клетками и в зависимости от функционального фенотипа могут участвовать как в подавлении опухолевого роста, так и промотировать прогрессию и метастазирование опухоли. При этом все больше внимания в изучении патогенеза опухолевых заболеваний и вопросов эффективности противоопухолевой терапии сосредоточено на клетках врожденного иммунитета, в том числе нейтрофилах. На сегодняшний день нейтрофилы рассматриваются в качестве клеток с многогранными функциями, включая противомикробную защиту, иммунорегулирующую функцию, участие в процессах репарации тканей, а также противоопухолевой защиты. В условиях опухолевого роста нейтрофилы демонстрируют функциональную дихотомию и могут не только ограничивать опухолевый рост, но также обладают проопухолевыми свойствами, способствуя прогрессии опухоли, метастазированию и уклонению от иммунного ответа. Учитывая такую двойственность функции, изучение роли нейтрофилов в опухолевых процессах остается крайне актуальным, поскольку понимание клинического значения подтипов опухоль-ассоциированных нейтрофилов и более детальное изучение механизмов их поляризации может способствовать разработке новых более эффективных стратегий терапии злокачественных опухолей, в том числе нацеленных на баланс между нейтрофилами с противоопухолевой и проопухолевой активностью.

Диссертационная работа Сунбули Хетам посвящена изучению фенотипа и функциональных особенностей опухоль-ассоциированных нейтрофилов при различных типах опухолей и влиянию терапии ДНКазой I на эти параметры. В работе рассматриваются важные аспекты функционирования нейтрофилов в развитии опухоли, исследуется способность опухоль-ассоциированных нейтрофилов к выбросу нейтрофильных внеклеточных ловушек (NET), в том числе при воздействии ДНКазы I.

Тема работы, несомненно, актуальна, а представленные данные расширяют понимание гетерогенности нейтрофилов в зависимости от типа опухоли и их реакции на противоопухолевый агент — ДНКазу I.

Научная новизна работы.

В рамках данного исследования впервые были предложены оптимальные референсные гены для исследования фенотипа нейтрофилов мыши методом RT-qPCR – *Tbp* и *Hprt1*. Изучена экспрессия *Tbp* и *Hprt1* в нейтрофилах относительно различного активационного статуса: в наивных незрелых нейтрофилах костного мозга и зрелых нейтрофилах селезенки здоровых мышей и мышей с разными типами опухолей. Показано, что эти гены стабильно экспрессируются в нейтрофилах мыши вне зависимости от статуса активации клеток.

Описан фенотип нейтрофилов селезенки мышей с опухолями разного гистогенеза (RLS₄₀, LLC и меланомой B16). Показана вариабельность фенотип опухоли-ассоциированных нейтрофилов селезенки мыши при развитии опухолей разного типа. Кроме того, было показано, что фенотип нейтрофилов коррелирует с размером опухоли: крупные опухоли характеризуются преобладанием проопухолевых иммуносупрессивных нейтрофилов, а при замедленном росте опухоли — противоопухолевых. Показано, что введение ДНКазы I модифицирует фенотип нейтрофилов за счет снижения иммуносупрессивных маркеров (*Il10*, *Ccl17*, мРНК) и повышения рецептора Fas и ингибиторного чекпойнт лиганда PD-L1.

В изучаемых мышинных моделях описана способность опухоли-ассоциированных нейтрофилов к нетозу, в том числе при введении ДНКазы I животным-опухоленосителям.

Таким образом, данная работа отличается высокой новизной. Полученные данные закладывают основу для дальнейших исследований, направленных на изучение фенотипа нейтрофилов при различных патологиях в мышинных моделях. Результаты углубляют знания о поляризации нейтрофилов в опухолевом микроокружении и демонстрируют перспективы для применения ДНКазы I в иммуномодулирующей противоопухолевой терапии.

Общая характеристика.

Диссертация Сунбули Хетам хорошо оформлена, написана грамотным языком, имеет традиционную структуру, состоит из разделов «Введение», «Обзор литературы», «Экспериментальная часть» (включая подразделы «Материалы» и «Методы»),

«Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Список литературы» и «Приложение». Библиография включает 384 источников. Работа изложена на 144 страницах, иллюстрирована 21 рисунками и 13 таблицами.

Раздел «Введение» содержит информацию об актуальности темы исследования, об основной цели и задачах работы, научной новизне, практической значимости, методологии и методах исследования. Кроме того, во «Введении» перечислены основные положения, выносимые на защиту, отражены данные по апробации, и личному вкладу соискателя.

Обзор литературы написан ясным научным языком, всесторонне охватывает множество различных материалов по теме исследования, соответствует его проблематике и исчерпывающе обосновывает актуальность. В первой главе подробно описываются основные характеристики и функции нейтрофилов. Во второй главе рассмотрены опухоль-ассоциированные нейтрофилы. Преимущество данного раздела заключается в том, что автор последовательно описывает опухоль-ассоциированные нейтрофилы начиная с особенностей возникновения вопроса и заканчивая современными представлениями. Подробно описывается пластичность нейтрофилов при развитии опухоли, изложена классификация (N1, N2), а также противоопухолевое и проопухолевое функционирования нейтрофилов, что удачно иллюстрировано соответствующим рисунком. Особое внимание уделено нейтрофильным внеклеточным ловушкам (NET). Автор обсуждает историю их изучения с первых упоминаний о NET в 70-х годах, описывает взаимодействие с опухолевыми клетками и как опухолевые клетки активируют нетоз. В завершающем разделе рассматриваются современные противоопухолевые терапевтические стратегии, сфокусированные на нейтрофилах. Обсуждаются методы, такие как ингибирование миграции нейтрофилов в опухоль, модулирование их фенотипа и разрушение NET. Следует отметить, что обзор подготовлен с соблюдением научных стандартов, содержит актуальную терминологию и данные, а также опирается на достоверные источники.

В главе «Экспериментальная часть» детально описаны методы выделения нейтрофилов из мыши и оценки их функциональной активности (флюориметрическая оценка уровня активных форм кислорода (ROS) и анализ NET с помощью микроскопии), фенотипирования нейтрофилов методом проточной цитометрии и RT-qPCR, получения культур клеток, инициации и ведения различных опухолевых моделей и гистологического анализа. Раздел содержит информацию об использованных реактивах

и буферах, оборудовании, антителах для проточной цитометрии, праймерах для ПЦР, клеточных линиях, лабораторных животных и опухолевых моделях.

Глава «Результаты и обсуждение» состоит из шести основных разделов и содержит полученные в ходе работы Сунбули Х. экспериментальные данные и их обсуждение. В первом разделе решается задача оптимизации выделения нейтрофилов из селезёнки мыши: автор сравнивает различные методы и демонстрирует преимущество иммуномагнитной положительной селекции, подтверждая сохранение функциональности нейтрофилов по способности к выбросу ROS и NET.

Второй раздел содержит результаты по исследованию экспрессии различных референсных генов в нейтрофилах мыши. Автор приводит данные по уровню и профилю экспрессии референсных генов в мышинных нейтрофилах различного состояния (нейтрофилы костного мозга, нейтрофилы селезенки здоровых мышей и нейтрофилы селезенки мышей опухоленосителей), и приводит результаты по стабильности экспрессии этих генов, полученные с помощью биоинформатических инструментов.

Исходя из полученных данных (выделение нейтрофилов и определение стабильно экспрессируемых референсных генов), в последующих разделах (3–4) анализируется фенотип нейтрофилов селезёнки мышей при развитии различных опухолей (LLC, RLS40, B16), а также влияние бычей панкреатической ДНКазы I на фенотип нейтрофилов в моделях RLS40 и B16.

Пятый раздел посвящён способности опухоль-ассоциированных нейтрофилов к нетозу. Автор приводит результаты микроскопического анализа уровня NET в нейтрофилах селезёнки здоровых мышей и опухоленосителей без терапии и после введения ДНКазы I.

В шестом разделе представлены результаты поляризации нейтрофилов *in vitro* с целью получения нейтрофилов противоопухолевого фенотипа. Результаты перспективны и заслуживают дальнейшего изучения в контексте применения поляризованных нейтрофилов в противоопухолевой терапии.

Заключение и выводы полностью соответствуют поставленным цели и задачам диссертационной работы соискателя.

Содержание автореферата полностью освещает основные идеи и выводы диссертационной работы.

Достоверность результатов и обоснованность выводов.

Высокая степень достоверности полученных результатов подтверждается достаточным объёмом экспериментального материала. Работа содержит обоснование

выбранных методов и качественный анализ полученных данных. Данные данного исследования апробированы на Российских и международных конференциях. Результаты диссертационного исследования опубликованы в трёх статьях в рецензируемых журналах, индексируемых базами Web of Science и Scopus. В каждой из них Сунбули Х. выступает первым автором.

Значимость работы.

Несомненную значимость имеют полученные в ходе выполнения работы данные по установлению оптимального способа выделения у мышей нейтрофилов из различных источников (костный мозг, селезенка) с высокой чистотой, жизнеспособностью и количественным выходом. Определение стабильно экспрессируемых референсных генов в нейтрофилах создают фундаментальную базу, которая может быть полезна другим исследователям, изучающим роль нейтрофилов в различных мышечных моделях.

Высокую научную ценность работы Сунбули Х. представляют полученные данные о функциональном фенотипе нейтрофилов в условиях опухолевого роста в различных экспериментальных моделях. Важным наблюдением также являются данные об изменении фенотипа опухоль-ассоциированных нейтрофилов при введении экспериментальным животным ДНКазы I. Эти результаты подтверждают важность изучения фенотипа нейтрофилов у онкологических пациентов и могут быть использованы для прогнозирования течения заболевания. Кроме того, иммуностимулирующий потенциал ДНКазы I продвигает ее в качестве перспективного вспомогательного средства при лечении онкологических заболеваний.

Замечания и предложения.

Изучая опухоль-ассоциированные нейтрофилы, автор оставил за кадром такую субпопуляцию клеток как полиморфно-ядерные супрессорные клетки миелоидного происхождения (PMN-MDSCs), содержание которых в условиях опухолевого роста существенно повышается и может быть неблагоприятным прогностическим маркером. PMN-MDSCs и N2-нейтрофилы имеют схожую морфологию, выделяются в низкой плотности, экспрессируют схожие иммуносупрессорные/противовоспалительные маркеры (IL-10, PD-L1, Arg-1, ROS и т.д.), однако до сих пор нет критериев, которые позволили бы четко различить эти две популяции клеток. В литературном обзоре автор подробно описывает характеристики N2-нейтрофилов, однако эти характеристики можно применить и к PMN-MDSCs, чего автор не сделал. Концепция MDSCs и опухоль-

ассоциированных нейтрофилов развиваются параллельно в течение последних 10-15 лет, поэтому эту проблему стоило осветить в литературном обзоре. Кроме того, выделяя клетки с помощью магнитной сортировки, были использованы два маркера Ly6G и CD11b, которые также являются маркерами мышиных PMN-MDSCs. Соответственно, не исключено, что при анализе выделенных клеток у мышей с различными опухолями, в общей популяции клеток могли присутствовать PMN-MDSCs, которые также экспрессируют все изученные в работе иммуносупрессорные маркеры. Однако, автор не учел этот аспект.

В качестве объекта исследования автор выбрал селезеночные нейтрофилы, поскольку они «могут отражать функциональное состояние нейтрофилов, выполнивших свою роль в организме, и поступивших в селезенку для клиренса». Однако, стоит отметить, что обнаруживаемые в селезенке мышей нейтрофилы являются не только клетками-мигрантами костномозгового происхождения, но на сегодняшний день обсуждается гипотеза об экстрамедулярном гранулопоэзе в селезенке. Соответственно, в условиях опухолевого роста эти процессы могут быть усилены. Автор не рассматривал полученные данные с этой точки зрения.

Важным замечанием является то, что автор ошибочно рассматривает экспрессию рецептора Fas на нейтрофилах как механизм противоопухолевого действия. Взаимодействие рецептора Fas со своим лигандом инициирует каскад каспаз, который в большинстве случаев приводит к апоптозу Fas⁺ клеток. При этом экспрессия Fas рассматривается как механизм, ограничивающий жизненный цикл нейтрофилов. Действительно, Fas относят к N1-ассоциированным маркерам, однако в этом случае это связано с механизмом активации иммунного воспаления за счет апоптоза нейтрофилов и усилением противоопухолевого ответа. Если изучаемые в работе типы опухолей экспрессируют FasL, то можно предположить, что полученные автором данные о более низкой экспрессии Fas на нейтрофилах при большей опухолевой нагрузке отражают усиленные процессы апоптоза этих клеток, а не истинную низкую экспрессию данного рецептора.

Автор утверждает, что введение ДНКазы I снижает способность нейтрофилов к образованию NET, что свидетельствует о потенциале данного фермента как эффективного средства для нетоз-зависимых механизмов в опухолевой патологии. Однако, эти высказывания являются преувеличенными, поскольку автор не получил значимых различий в своей работе.

В заключительной серии экспериментов автор описывает полученный в результате поляризации фенотип нейтрофилов как N1, при этом экспрессирующий маркер N2 –PD-L1. На сегодняшний день, становится очевидным, что концепция N1/N2 не отражает всю функциональную и фенотипическую пластичность нейтрофилов из-за их множественного разнообразия. В этом аспекте автору тоже стоило проявить «пластичность» и попытаться выдвинуть свою гипотезу относительно того, как можно обозначить полученный вариант нейтрофилов.

В качестве дискуссии хотелось бы обсудить три вопроса.

1. С чем связан разный характер роста перевиваемых опухолей у мышей, если были использованы линейные мыши одного и того же возраста, один срок наблюдения, а также одни и те же субтипы опухолевых линий?

2. Какой эффект ДНКазы I-стимулированная экспрессия PD-L1 на нейтрофилах может оказывать на PD-1-экспрессирующие эффекторные Т-клетки, присутствующие в опухолевом микроокружении? Как терапия препаратами на основе ДНКазы I может сочетаться с ингибиторами PD-1/PD-L1-сигнального пути?

3. Какие вы видите перспективы транслирования полученных данных в клиническую практику, если известно, что, нейтрофилы человека и мышей существенно различаются, зачастую началу терапии предшествует резекция опухоли, существенные индивидуальные различия между пациентами, при этом у человека доступными для исследования являются периферическая кровь пациентов и ткани опухоли?

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 завершенное научное исследование, в котором решена важная задача по изучению фенотипических и функциональных свойств опухоль-ассоциированных нейтрофилов, имеющая фундаментальное значение для понимания пластичности врожденного иммунного ответа в опухоли и разработки новых стратегий иммунотерапии.

Несмотря на некоторые замечания, которые носят дискуссионный и рекомендательный характер, диссертационная работа Сунбули Хетам по актуальности темы, объёму, научной новизне, теоретической и практической значимости отвечает требованиям, установленным Институтом химической биологии и фундаментальной

медицины СО РАН для диссертаций, представленных на соискание ученой степени кандидата наук. 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. Автор диссертации, Сунбули Хетам, заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – молекулярная биология.

«02» декабря 2025 г.

Официальный оппонент

Тамара Викторовна Тыринова

Заведующий лабораторией клеточно-молекулярных механизмов иммунопатологии

Ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение

«Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии»
(НИИФКИ)

д.б.н.

/Тамара Викторовна Тыринова

Адрес: 630099, Новосибирск, ул. Ядринцевская, д. 14

Рабочий телефон: (383) 228 -01-21

e-mail: tyrinova@bk.ru

Личную подпись д.б.н. Т.В. Тыриновой заверяю:

Ученый секретарь НИИФКИ, к.б.н.

02 декабря 2025 г.



/Елена Давидовна Гаврилова