

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 001.001.01 НА БАЗЕ  
ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО НАУЧНОГО  
УЧРЕЖДЕНИЯ «НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ  
ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ И КЛИНИЧЕСКОЙ ИММУНОЛОГИИ» ПО  
ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

аттестационное дело № \_\_\_\_\_

решение диссертационного совета от 28 апреля 2016 № 239

О присуждении Хантаковой Юлии Николаевне, гражданке РФ, ученой степени кандидата медицинских наук.

Диссертация «Влияние дендритных клеток, трансфицированных полиэпитопными ДНК-конструкциями, на индукцию цитотоксического ответа культуры моноклеарных клеток больных раком молочной железы» по специальности 14.03.09 – «Клиническая иммунология, аллергология» принята к защите 16 февраля 2016 года, протокол № 236 диссертационным советом Д001.001.01 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» (НИИФКИ), почтовый индекс 630099, адрес организации: г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, дом 14, действующего на основании приказа № 714 от 02.11.2012 года.

Соискатель Хантакова Юлия Николаевна, 1988 года рождения, в 2011 году окончила Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Новосибирский государственный университет» (в настоящее время Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет»).

Проходит очное обучение в аспирантуре Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» по специальности 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология.

Диссертация выполнена в лаборатории молекулярной иммунологии отдела экспериментальной иммунологии НИИФКИ.

**Научный руководитель** – доктор медицинских наук, профессор Сенников Сергей Витальевич, заведующий лабораторией молекулярной иммунологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии».

**Официальные оппоненты:**

1. **Повещенко Ольга Владимировна**, доктор медицинских наук, заведующая лабораторией клеточных технологий, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии»
2. **Миронова Надежда Львовна**, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биохимии нуклеиновых кислот, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт химической биологии и фундаментальной медицины» Сибирского отделения Российской академии наук.

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Томский научно-исследовательский институт онкологии» в своем положительном заключении, подписанном Чердынцевой Надеждой Викторовной, доктором биологических наук, профессором, заместителем директора по научной работе, указала, что в работе на основании полученных автором данных осуществлено решение актуальной задачи - изучению возможности дендритных клеток, трансфицированных полиэпитопными HLA-A\*02:01-специфичными ДНК-конструкциями, кодирующими отдельные иммуногенные детерминанты опухоль-ассоциированных антигенов, стимулировать развитие цитотоксического противоопухолевого иммунного ответа в культуре моноклеарных клеток у больных раком молочной железы. Выводы и рекомендации достаточно обоснованы. По актуальности темы, объему проведенных исследований, научной и практической значимости полученных результатов диссертационная работа Хантаковой Ю.Н. полностью отвечает требованиям п. 9 «Положения о



порядке присуждения ученых степеней», предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает искомой степени кандидата медицинских наук.

Соискатель имеет 16 печатных работ, в том числе 3 статьи в научных журналах и изданиях, которые включены в перечень российских рецензируемых научных журналов и изданий для опубликования основных научных результатов диссертаций, а также 1 работу в зарубежном научном издании, входящего в международную базу цитирования Web of science, 1 патент на изобретение.

Наиболее значимые научные работы по теме диссертации:

1. Курилин В.В., Хантакова Ю.Н., Облеухова И.А., Шевченко Ю.А., Куликова Е.В., Якушенко В.К., Соколов А.В., Сенников С.В. Стимуляция дендритными клетками *in vitro* противоопухолевой цитотоксической активности моноклеарных клеток больных колоректальным раком. // Медицинская иммунология.- 2013.- Т.15.- №3.- С.235-246.

2. Шевченко Ю.А., Хантакова Ю.Н., Курилин В.В., Лопатникова Ю.А., Сидоров С.В., Козлов В.А., Сенников С.В. Стимуляция цитотоксического иммунного ответа в культуре моноклеарных клеток больных раком молочной железы дендритными клетками, нагруженными антигенами опухолевых лизатов. // Иммунология.- 2013.- Т.134.- №6.- С.327-330.

3. Максютков А.З., Лопатникова Ю.А., Курилин В.В., Шевченко Ю.А., Хантакова Ю.Н., Гаврилова Е.В., Максютков Р.А., Перегудов А.Г., Зайцев С.А., Козлов В.А., Сенников С.В. Исследование эффективности индукции цитотоксического иммунного ответа моноклеарными клетками с помощью дендритных клеток, трансфицированных полиэпитопными конструкциями HER2/ErbB2. Медицинская иммунология, 2014, Т. 16, № 5, стр. 417-424

4. Sennikov S.V, Shevchenko J.A., Kurilin V.V., Khantakova J.N., Lopatnikova J.A., Gavrilova E.V., Maksyutov R.A., Bakulina A.Y., Sidorov S.V., Khristin A.A., Maksyutov A.Z. Induction of an antitumor response using dendritic cells transfected with DNA constructs encoding the HLA-A\*02:01-restricted epitopes of tumor-associated antigens in culture of mononuclear cells of breast cancer patients. // Immunologic Research. – 2016. – Vol. 64(1). – p.171-80.

5. Пат. 2521506 Российская Федерация, МПК C12N5/0783, 5/0784,

A61K48/00, A61P35/00. Способ генерации антиген-специфических цитотоксических клеток с противоопухолевой активностью при раке молочной железы. / Сенников С.В., Шевченко Ю.А., Хантакова Ю.Н., Курилин В.В., Лопатникова Ю.А., Сидоров С.В., Волгушев С.А., Оглоблин В.П., Ефимова Л.В., Теплова Н.В. - №2013114856/10, заявл. 01.04.2013г., опубл. 27.06.2014г., Бюл.18 – С.11.

Все основные результаты, представленные на защиту, опубликованы в оригинальных статьях в рецензируемых изданиях и тезисах докладов в сборниках научных конференций. Основные экспериментальные и клинические результаты, их статистическая обработка и представление в виде публикаций выполнены соискателем лично.

На автореферат поступило 3 отзыва от:

1. ведущего научного сотрудника, заведующего лабораторией молекулярно-клеточных механизмов терапевтических заболеваний «НИИ терапии и профилактической медицины», доктора медицинских наук **Шварца Якова Шмульевича**.
2. старшего научного сотрудника Федерального исследовательского центра Института цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, кандидата биологических наук **Поповой Нелли Александровны**.
3. заведующего лабораторией экологической иммунологии, института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН, кандидата медицинских наук **Бахметьева Бориса Аркадьевича**.

Во всех отзывах отмечается высокая актуальность темы диссертационного исследования, указывается, что результаты работы демонстрируют потенциальные возможности для разработки новых направлений в таргетной иммунотерапии рака молочной железы. Отмечается, что принципиальным результатом, полученным в работе, является экспериментальное подтверждение возможности индукции эффективного противоопухолевого иммунного ответа с помощью зрелых дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкциями, кодирующими поли-ЦТЛ-эпитопный иммуноген, содержащими HLA-A\*02:01-



специфические антигенные детерминанты опухоль-ассоциированных антигенов. Все отзывы положительные, критических замечаний не содержат.

Выбор ведущей организации обосновывается тем, что **ФГБУ «Томский НИИ онкологии»** является одним из ведущих научно-медицинских онкологических центров России, осуществляющим комплексное решение фундаментальных и практических проблем современной онкологии. В институте активно проводятся фундаментальные исследования по изучению закономерностей распространения и патогенеза злокачественных новообразований, выявлению эндогенных и экзогенных этиологических факторов и их комплексов с целью разработки программ по ранней диагностике и профилактике онкологических заболеваний. Кроме того, активно изучаются системы жизнеобеспечения организма и молекулярно-генетические характеристики опухоли, отражающие механизмы канцерогенеза и опухолевой прогрессии.

Выбор официального оппонента, доктора биологических наук, **О.В. Повещенко** обосновывается ее работами, посвященных разработке клеточных препаратов на основе аутологичных клеток, анализу взаимосвязей параметров морфофункциональных свойств клеточного препарата с показателями клинической эффективности при различных патологических состояниях, в том числе и при онкологических заболеваниях.

Выбор официального оппонента, кандидата биологических наук **Н.Л. Мироновой** обосновывается ее исследованиями регуляции экспрессии генов, а также путей доставки генетического материала в клетку для создания терапевтических средств на основе олигонуклеотидов и их аналогов.

**Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:**

**Предложена** методика генерации зрелых дендритных клеток с последующей трансфекцией их ДНК-конструкциями, кодирующими поли-ЦТЛ-эпитопные иммуногены, содержащие HLA-A\*02:01-специфические антигенные детерминанты опухоль-ассоциированных антигенов.

**Доказано**, что зрелые дендритные клетки, трансфицированные ДНК-конструкцией, кодирующей поли-ЦТЛ-эпитопный иммуноген, содержащей

HLA-A\*02:01-специфические антигенные детерминанты опухоли-ассоциированного белка Her2/neu, в отличие от ДНК-конструкции, кодирующей полноразмерный белок ErbB2, более эффективно стимулируют формирование цитотоксического ответа в культуре МНК условно-здоровых доноров против опухолевых клеток линии рака молочной железы человека MCF-7.

**Доказано**, что зрелые дендритные клетки, трансфицированные ДНК-конструкциями, кодирующими поли-ЦТЛ-эпитопные иммуногены, содержащие HLA-A\*02:01-специфические антигенные детерминанты опухоли-ассоциированных антигенов, способствуют развитию противоопухолевого ответа культуры моноклеарных клеток против аутологичных опухолевых клеток в общей группе и в группе HLA-A\*02-позитивных больных раком молочной железы.

**Доказано**, что в группе HLA-A\*02-негативных больных раком молочной железы при добавлении иммунорегуляторных цитокинов ИЛ-12 и ИЛ-18 происходит развитие цитотоксических реакций в совместных культурах моноклеарных клеток и дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкциями, кодирующими поли-ЦТЛ-эпитопные иммуногены, содержащие HLA-A\*02:01-специфические антигенные детерминанты опухоли-ассоциированных антигенов.

**Доказано**, что в отличие от дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкциями, кодирующими поли-ЦТЛ-эпитопные иммуногены, содержащие HLA-A\*02:01-специфические антигенные детерминанты опухоли-ассоциированных антигенов, дендритные клетки, праймированные антигенами лизата аутологичных опухолевых клеток только при добавлении иммунорегуляторных цитокинов ИЛ-12 и ИЛ-18 способствуют индукции цитотоксического ответа культуры моноклеарных клеток больных раком молочной железы против аутологичных опухолевых клеток.

**Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:**

**Показан** эффективный способ активации моноклеарных клеток с использованием дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкциями, кодирующими отдельные поли-ЦТЛ-эпитопные иммуногены, содержащие HLA-



A\*02:01-специфические антигенные детерминанты опухоль-ассоциированных антигенов.

**Выявлена** зависимость уровня стимуляции моноклеарных клеток зрелыми дендритными клетками, трансфицированными HLA-A\*02:01-специфическими ДНК-конструкциями, от HLA-A-гаплотипа больного и от структуры подобранных иммуногенов, входящих в ДНК-конструкции.

#### **Применительно к проблематике диссертации результативно**

**Использован** комплекс существующих современных экспериментальных методик, включающих проточную цитофлуорометрию, методы магнитной трансфекции и оценки ее эффективности, методы культивирования клеток.

**Раскрыта** роль структуры подобранных иммуногенов, входящих в ДНК-конструкцию, применения зрелых дендритных клеток, трансфицированных полиэпитопной ДНК-конструкцией для индукции эффективного цитотоксического ответа в культуре моноклеарных клеток HLA-A\*02-позитивных условно-здоровых доноров против опухолевых клеток линии MCF-7 при сравнении с дендритными клетками, трансфицированными полноразмерной ДНК-конструкцией.

**Доказана** возможность индукции антиген-специфического цитотоксического иммунного ответа в культуре моноклеарных клеток зрелых дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкциями, кодирующими поли-ЦТЛ-эпитопные иммуногены, содержащие HLA-A\*02:01-специфические антигенные детерминанты опухоль-ассоциированных антигенов, против аутологичных опухолевых клеток у больных раком молочной железы в целом, и в группе HLA-A\*02-позитивных больных.

**Изучен** стимулирующий эффект дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкциями, кодирующими поли-ЦТЛ-эпитопные иммуногены, содержащие HLA-A\*02:01-специфические антигенные детерминанты опухоль-ассоциированных антигенов, на количество перфорин-позитивных клеток в культурах моноклеарных клеток больных раком молочной железы.

**Показано** преимущество использования полиэпитопных HLA-A\*02:01-специфических ДНК-конструкций для праймирования зрелых дендритных клеток по сравнению с антигенами лизата аутологичных опухолевых клеток, с

целью формирования эффективного клеточно-опосредованного противоопухолевого ответа культуры моноклеарных клеток больных раком молочной железы.

**Показана** возможность усиления формирующихся антиген-специфических клеточных реакций под воздействием иммунорегуляторных цитокинов ИЛ-12 и ИЛ-18 на развитие цитотоксического ответа в культуре моноклеарных клеток HLA-A\*02-негативных больных раком молочной железы при сокультивировании зрелых дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкциями, кодирующими поли-ЦТЛ-эпитопные иммуногены, содержащие HLA-A\*02:01-специфические антигенные детерминанты опухоль-ассоциированных антигенов.

**Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что**

**Представленные** новые научные результаты, которые могут стать предпосылкой для разработки современных подходов клеточной иммунотерапии рака молочной железы, основанной на использовании зрелых дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкциями, кодирующими поли-ЦТЛ-эпитопные иммуногены, содержащие HLA-A\*02:01-специфические антигенные детерминанты опухоль-ассоциированных антигенов, для формирования цитотоксических CD8<sup>+</sup> Т-клеток, способных вызывать гибель опухолевых клеток.

**Оценка достоверности результатов исследования выявила:** исследование проведено на сертифицированном оборудовании; полученные автором данные сопоставимы с опубликованными в научной литературе результатами о применении трансфицированных дендритных клеток для формирования цитотоксического противоопухолевого иммунного ответа против опухолевых клеток. Для математической обработки полученных результатов использованы современные методы сбора и обработки информации. Количество наблюдений достаточное. Выводы соответствуют поставленным задачам и логически вытекают из полученных данных.

**Личный вклад соискателя состоит в:** непосредственном участии в получении исходных данных и научных экспериментах. Автором был проведен



анализ имеющейся научной информации по теме исследования. Экспериментальная работа с культурами клеток выполнена лично автором и включала выделение моноклеарных клеток из периферической крови условно-здоровых доноров и больных раком молочной железы, культивирование моноклеарных клеток *in vitro* в присутствии и отсутствии различных групп праймированных зрелых дендритных клеток, исследовании цитотоксической способности полученных клеток. Статистическая обработка и интерпретация экспериментальных данных проведена лично автором. Научные положения и выводы, сделанные в диссертационной работе, обоснованы результатами собственных исследований автора. Подготовка основных публикаций по выполненной работе проведена при непосредственном участии автора.

На заседании 28 апреля 2016 года диссертационный совет принял решение присудить Хантаковой Ю.Н. ученую степень кандидата медицинских наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 19 человек, из них 10 докторов наук по специальности 14.03.09 – «Клиническая иммунология, аллергология» (медицинские науки), участвовавших в заседании, из 22 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за присуждение учёной степени 19 , против присуждения учёной степени 0 , недействительных бюллетеней 0.

Председатель диссертационного совета,  
доктор медицинских наук,  
профессор, академик РАН



Козлов Владимир  
Александрович

Ученый секретарь диссертационного  
совета, кандидат медицинских наук

Белгородцев  
Сергей  
Николаевич