

**Отзыв официального оппонента**  
**доктора биологических наук Мироновой Надежды Львовны**  
на диссертацию Кузнецовой Марии Сергеевны  
«Фенотипические и функциональные характеристики *in vitro*-  
генерированных цитотоксических Т-лимфоцитов, специфичных к эпитопам  
антигена HER2/neu», представленную на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук по специальности 14.03.09 – Клиническая  
иммунология, аллергология.

**Актуальность темы выполненной работы**

Работа Кузнецовой М.С. посвящена исследованию фенотипических и функциональных свойств цитотоксических Т-лимфоцитов, специфичных к эпитопам опухоль-ассоциированного антигена HER2/neu, а также возможности индукции специфического Т-клеточного иммунного ответа против клеток рака молочной железы, экспрессирующих данный антиген.

На протяжении многих лет рак молочной железы остается ведущей онкопатологией у женского населения России. При этом, согласно данным Московского научно-исследовательского онкологического института имени П.А. Герцена, в 2017 г. уровень смертности от данного типа рака сохранил за собой первое место. Среди выделяемых форм рака молочной железы HER2-позитивная форма считается наиболее агрессивной и ассоциирована с плохим клиническим прогнозом, в связи с чем исследования, связанные с данным антигеном, не теряют своей актуальности.

Фундаментальные и клинические исследования последних лет подтверждают, что использование потенциала иммунной системы дает возможность эффективно уничтожать опухолевые клетки, несущие на своей поверхности опухолевые антигены.

Кузнецовой М.С. предложен подход к *in vitro* генерации специфического противоопухолевого иммунного ответа, основанный на модификации подхода к активации моноклеарных клеток с помощью дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкцией, кодирующей эпитопы антигена HER2/neu, путём добавления этапа обнаружения и выделения чистых популяций HER2-специфичных CD8<sup>+</sup> Т-клеток с использованием технологии стрептамеров.

Полученные данные являются новыми и актуальными для области развития противоопухолевых вакцин на основе антиген-специфичных цитотоксических Т-лимфоцитов.

**Структура и объем диссертации**

Диссертационная работа Кузнецовой М.С. построена по традиционной схеме и состоит из введения, 4 глав, содержащих обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты собственных исследований с их обсуждением, выводов и списка литературы. Работа изложена на 136 страницах машинописного текста, содержит 23 рисунка, 4 таблицы и список цитируемой литературы из 195 источников.

Во введении автор формулирует цели и задачи своей работы, обосновывает актуальность исследования, оценивает научную новизну и потенциальную практическую значимость результатов, формулирует положения, выносимые на защиту.

Глава 1, содержащая обзор литературы, состоит из 6 разделов, и посвящена роли Т-клеточного звена в противоопухолевом иммунном ответе. Автором рассмотрены концепция иммуноредактирования и основные подходы к генерации противоопухолевого клеточного иммунного ответа, детальная характеристика  $CD8^+$  Т-лимфоцитов, включая существующие теоретические модели их дифференцировки и классификации, а также методы исследования данных клеток. Также обзор литературы освещает использование дендритных клеток для активации цитотоксических Т-лимфоцитов и основную классификацию опухоль-ассоциированных антигенов с подробным описанием антигенного белка HER2/neu. Обзор отражает современные представления о предмете исследования и свидетельствует о высокой квалификации автора в области иммунобиологии.

Глава 2, содержащая описание материалов и методов, подробно описывает научно-методологические подходы, примененные автором для решения поставленных задач и достижения цели исследования. В исследовании используется широкий спектр современных иммунологических и молекулярно-биологических методов, включая такие как восьмицветная проточная цитометрия, доставка ДНК плазмид в клетки методами электропорации, магнитной трансфекции и нуклеофекции, выделение ДНК из цельной периферической венозной крови, HLA-генотипирование, окрашивание антиген-специфичных клеток по технологии МНС-стрептамеров, магнитная сортировка антиген-специфичных  $CD8^+$  Т-клеток, ИФА и анализ цитотоксичности. Все методики, использованные и оптимизированные в исследовании, детально прописаны и пояснены, что предоставляет возможность для воспроизведения экспериментов по приведенным протоколам.

Главы 3 и 4 посвящены изложению и обсуждению результатов получения популяций цитотоксических Т-лимфоцитов, специфичных к эпитопам E75 и E88 белка HER2, гиперэкспрессируемого клетками рака молочной железы, и оценке их противоопухолевой активности и субпопуляционного состава. В рамках диссертационной работы Кузнецовой М. С. разработан и оптимизирован протокол получения и популяций цитотоксических Т-лимфоцитов, специфичных к иммуногенным эпитопам E75 и E88 белка HER2/neu. Показано, что получаемые популяции характеризуются высокими уровнями содержания  $CD8^+$  Т-лимфоцитов, цитотоксической активности против опухолевых клеток линии аденокарциномы молочной железы MCF-7 и продукции ИФН-гамма в ответ на предъявление клеток-мишеней. Автором подробно охарактеризован субпопуляционный состав E75-специфичных и E88-специфичных Т-лимфоцитов культуры мононуклеарных клеток и дендритных клеток,

трансфицированных ДНК-конструкцией, кодирующей эпитопы антигена HER2/neu. Результаты проиллюстрированы многочисленными рисунками, которые облегчают восприятие материала.

Достоверность полученных результатов подтверждается статистической обработкой данных с использованием корректно подобранных критериев и тестов. Выводы основываются на фактически полученном автором материале и отражают суть проведенного экспериментального исследования. Автор выносит на защиту 2 научных положения, логично вытекающие из анализа результатов исследования и в достаточной степени аргументированные полученными результатами. Обоснованность научных положений и выводов, таким образом, не вызывает сомнений. Материал, представленный в диссертации, получен и проанализирован автором исследования лично.

### **Научная новизна и научно-практическая значимость полученных результатов**

Научно-практическая значимость работы обусловлена разработанным и запатентованным протоколом получения HER2-специфичных цитотоксических Т-лимфоцитов, который может послужить основой для создания технологии получения и адоптивного Т-клеточного переноса противоопухолевых HER2-специфичных Т-лимфоцитов пациентам с HER2-позитивным раком молочной железы и других локализаций, сопряженных с гиперэкспрессией HER2.

Именно оптимизация протокола окрашивания и магнитной сортировки антиген-специфичных цитотоксических Т-лимфоцитов позволила исследовать эффекторные свойства и особенности субпопуляционного состава непосредственно антиген-специфических популяций клеток, а не смешанных культур моноклеарных клеток, лишь частично представленных данными популяциями, чем в значительной степени обусловлена научная и практическая новизна работы.

### **Достоверность и обоснованность результатов исследований**

Достоверность полученных результатов обеспечена использованием широкого спектра современных иммунологических и молекулярно-биологических методов исследований, детальным анализом полученных данных и корректными способами статистической обработки.

Результаты диссертационной работы опубликованы в пяти рецензируемых журналах (в том числе 4 из них в периодических изданиях, рекомендованных ВАК), доложены и обсуждены на восьми всероссийских и международных научных форумах и конференциях и представлены в виде одного патента РФ.

Следует отметить некоторые недостатки и замечания, которые возникают при тщательном изучении работы.

1. Во введении отсутствует раздел «Структура и объем диссертации», хотя этот раздел присутствует в автореферате.

2. Обзор литературы объединен рисунками: разделы «1.2. Роль цитотоксических Т-лимфоцитов в противоопухолевом иммунном ответе» и «1.3 Дифференцировка и созревание цитотоксических Т-лимфоцитов». В связи со сложной взаимосвязью между эффекторными Т-лимфоцитами и Т-клетками памяти необходимо было дополнить эти разделы рисунками. В разделе «1.5. Иммунобиология дендритных клеток», так же было бы логичным привести рисунок, отражающий процесс созревания ДК и изменяющийся при этом паттерн ко-стимулирующих молекул. Рисунки 1.1. – 1.4, приведенные в обзоре литературы, содержат надписи на английском языке. Автор в обзоре литературы разделяет опухолевые антигены на два типа – опухоль-специфичные и опухоль-ассоциированные, однако, далее идет описание только опухоль-ассоциированных антигенов. В связи с этим вопрос – а что же такое опухоль-специфичные антигены?

3. В «Главе 2. Материалы и методы исследования» приведены рисунки 2.2. (схема экспериментальной части работы с моноклеарными клетками условно-здоровых доноров) и 2.3 (электрофореграммы образцов ДНК, генотипированных по локусу А HLA), хотя более логично было привести их в Главе 3 «Результаты собственных исследований».

4. Вопрос к рис. 3.2. Чем вы объясняете больший выход CD14<sup>+</sup> клеток при инкубации на пластике в течение 30 минут, не, например, 120 минут? Поскольку логично было бы предположить, что большее время приведет к адгезии большего количества клеток. Так же вопрос, какую статистическую обработку вы использовали в данном случае? Это не указано в подписи к рисунку, а пересечения стандартной ошибки среднего для всех показателей не позволяет сделать наглядного заключения о достоверных различиях.

Рис. 3.13. В диссертации не приведена цветная кодировка исследуемых субпопуляций Т-клеток на рисунке и в подписи, тем не менее, в автореферате это упущение исправлено.

Присутствует некоторое количество сленговых терминов, повторов и не удачных выражений.

Тем не менее, сделанные замечания имеют дискуссионный характер, не снижают научной ценности полученных результатов и сделанных выводов и ни в коей мере не умаляют хорошего впечатления от работы.

### **Заключение**

В целом, проведенное диссертационное исследование является законченной самостоятельной научно-квалификационной работой, проведенной на высоком научно-методологическом уровне. Следует особо отметить, что материалы диссертации вполне могут быть включены в программы преподавания иммунологических дисциплин в медицинских и биологических ВУЗах, а также в учебный план аспирантуры и ординатуры по специальности 14.03.09 Клиническая иммунология, аллергология.

Автореферат полностью отражает основное содержание диссертации, оформлен в соответствии с требованиями, установленными «Положением о присуждении ученых степеней».

Диссертационная работа соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, согласно п.9 Положения о порядке присуждения ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842 (в ред. Постановлений Правительства РФ №335 от 21.04.2016, №748 от 02.08.2016, №650 от 29.05.2017, №1024 от 28.08.2017, №1168 от 01.10.2018 «О внесении изменений в Положение о присуждении ученых степеней»), а Кузнецова Мария Сергеевна, несомненно, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология.

Официальный оппонент,  
Доктор биологических наук,  
ведущий научный сотрудник  
лаборатории биохимии  
нуклеиновых кислот Федерального  
государственного бюджетного  
учреждения науки «Институт  
химической биологии и  
фундаментальной медицины»  
Сибирского отделения Российской  
академии наук (ИХБФМ СО РАН)

 Н.Л. Миронова

Диссертация на соискание ученой  
степени доктора биологических  
наук защищена по специальности  
03.01.04 – биохимия

Подпись Н.Л. Мироновой заверяю:  
Ученый секретарь ИХБФМ СО  
РАН,  
Кандидат химических наук



 П.Е. Пестряков