

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 05 сентября 2019 № 253

О присуждении Кузнецовой Марии Сергеевне, гражданке РФ, ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Фенотипические и функциональные характеристики *in vitro*-генерированных цитотоксических Т-лимфоцитов, специфичных к эпитопам антигена HER2/neu» по специальности 14.03.09 – «Клиническая иммунология, аллергология» принята к защите 30 мая 2019 года, протокол № 250 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 Минобрнауки России № 714 от 02.11.2012 года.

Соискатель Кузнецова Мария Сергеевна, 1992 года рождения, в 2014 году окончила Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет» (НГУ),

в 2018 году окончила заочное обучение в аспирантуре Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» (НИИФКИ) по специальности 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология.

Работает в должности младшего научного сотрудника лаборатории молекулярной иммунологии НИИФКИ.

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. **Хайдуков Сергей Валерьевич**, доктор биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории углеводов отдела химической биологии гликанов и липидов Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук.
2. **Миронова Надежда Львовна**, доктор 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 научное учреждение «Томский национальный медицинский центр Российской академии наук» (Томский НИМЦ) в своем положительном заключении, подписанном Мариной Николаевной Стахеевой, доктором медицинских наук, ведущим научным сотрудником лаборатории молекулярной онкологии и иммунологии НИИ онкологии Томского НИМЦ, указывает, что диссертационная работа Кузнецовой Марии Сергеевны является актуальной и имеет важное фундаментальное и прикладное значение, решая важную задачу изучения особенностей и условий развития противоопухолевого антиген-специфического Т-клеточного иммунного ответа. Выводы представляют собой логичные заключения по каждой из поставленных задач, последний вывод при этом является обобщающим и позволяет сформировать цельное видение всей проведенной работы. По актуальности темы, объему проведенных исследований, научной и практической значимости полученных результатов диссертационная работа Кузнецовой М.С. отвечает всем требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, согласно п.9. «Положения о порядке

присуждения ученых степеней», а ее автор заслуживает искомой степени кандидата биологических наук по специальности 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология.

Соискатель имеет 13 опубликованных работ по теме диссертации, в том числе 4 статьи в научных журналах и изданиях, которые включены в перечень российских рецензируемых научных журналов и изданий для опубликования основных научных результатов диссертаций, в том числе 2 статьи в зарубежных научных журналах, входящих в международную базу цитирования Web of science, а также 1 патент на изобретение.

Наиболее значимые научные работы по теме диссертации:

1. Шевченко Ю.А., Христин А.А., Фалалеева С.А., Курилин В.В., **Кузнецова М.С.**, Сидоров С.В., Сенников С.В. Фенотипические и функциональные свойства дендритных клеток и содержание супрессорных клеточных популяций в периферической крови больных раком молочной железы. // Вопросы онкологии. – 2016. – Т. 62. – № 4. – с. 519-523.
2. Сенников С.В., Лопатникова Ю.А., **Кузнецова М.С.**, Хантакова Ю.Н., Куликова Е.В., Максютлов А.З. Патент на изобретение «Способ получения *in vitro* популяций активированных антигенспецифических противоопухолевых цитотоксических Т-лимфоцитов, специфичных к эпитопам опухоль-ассоциированного антигена». №2619186. Опубл. 12.05.2017. Бюл. №14.
3. **Maria Kuznetsova**, Julia Lopatnikova, Julia Khantakova, Rinat Maksyutov, Amir Maksyutov, Sergey Sennikov. Generation of populations of antigen-specific cytotoxic T cells using DCs transfected with DNA construct encoding HER2/neu tumor antigen epitopes. // BMC Immunology. – 2017. – Vol. 18(1) . – № 31. doi: 10.1186/s12865-017-0219-7.
4. **Kuznetsova M.**, Lopatnikova J., Kalichkin A., Sennikov S. Development of technology for obtaining antigen-specific cytotoxic T lymphocytes using DCs transfected with DNA construct encoding HER2/neu tumor antigen epitopes. // European Journal of Immunology. – 2018. – Vol 48(1): 177. DOI: 10.1002/eji.201871000

5. **Kuznetsova Maria**, Lopatnikova Julia, Shevchenko Julia, Silkov Alexander, Maksyutov Amir, Sennikov Sergey. Cytotoxic activity and memory T cell subset distribution of in vitro-stimulated CD8⁺ T cells specific for HER2/neu epitopes. // *Frontiers in Immunology*. – 2019. – Vol. 10. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01017.

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:

- 1) заведующей лабораторией рекомбинантных вакцин ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, доктора биологических наук, доцента **Карпенко Ларисы Ивановны;**
- 2) заведующей Базовой лабораторией иммунологии и клеточных биотехнологий Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Балтийский федеральный университет им. И. Канта», доктора медицинских наук **Литвиновой Ларисы Сергеевны;**
- 3) старшего научного сотрудника отдела иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», кандидата биологических наук **Кудрявцева Игоря Владимировича.**

Во всех отзывах отмечается высокая актуальность темы диссертационного исследования, практическая значимость работы, продуманный дизайн исследования и технологичность разработанного протокола получения целевых клеток. Среди полученных результатов выделяется экспериментальное определение субпопуляционного состава исследуемых HER2-специфичных цитотоксических Т-лимфоцитов, определение различий в содержании HER2-специфичных Т-клеток у здоровых индивидов и больных HER2-позитивной формой рака молочной железы, а также показанная выраженная цитотоксичность выделенных популяций целевых клеток против HER2-

экспрессирующих опухолевых клеток линии MCF-7. Все отзывы положительные, критических замечаний не содержат.

Выбор ведущей организации обосновывается тем, что **Томский НИМЦ** является одним из ведущих научно-медицинских центров России, осуществляющим комплексное решение фундаментальных и практических проблем современной онкологии и иммунологии. В частности, лаборатория молекулярной онкологии и иммунологии НИИ онкологии Томского НИМЦ занимается изучением механизмов про- и противоопухолевой функциональной направленности иммунной системы в качестве потенциальных мишеней коррекции исхода онкологических заболеваний и увеличения эффективности противоопухолевого лечения. В подразделениях Томского НИМЦ активно проводятся фундаментальные исследования по изучению закономерностей распространения и механизмов патогенеза злокачественных новообразований, выявлению эндогенных и экзогенных этиологических факторов и их комплексов с целью разработки программ по ранней диагностике, профилактике и совершенствованию организации онкологической помощи населению региона. Кроме того, на базе Томского НИМЦ разрабатываются новые эффективные схемы терапии онкологических больных на основе использования высокотехнологичных подходов, совершенствования режимов адъювантной терапии, патогенетически обоснованного применения новых химиопрепаратов и модификаторов цитостатической терапии. При этом рак молочной железы является одной из нозологий, исследуемых в подразделениях НИИ онкологии Томского НИМЦ.

Выбор официального оппонента, доктора биологических наук **С.В. Хайдукова**, обосновывается его достижениями в области научных исследований клеточного звена иммунитета при различных заболеваниях, в том числе онкологических, в области изучения субпопуляций Т-клеток, а также профессиональным владением методами многоцветного анализа в проточной цитометрии для определения субпопуляций клеток иммунной системы.

Выбор официального оппонента, доктора биологических наук **Н.Л. Мироновой**, обосновывается ее достижениями в исследованиях генерации противоопухолевого иммунного ответа с помощью дендритных клеток, а также

изучении 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:

Разработан новый способ получения *in vitro* популяций цитотоксических Т-лимфоцитов, специфичных к эпитопам опухоль-ассоциированного антигена HER2/neu, с помощью дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкцией, кодирующей эпитопы белка HER2/neu, технологии стрептамеров и магнитной сепарации антиген-специфичных клеток, позволяющий получать популяции HER2-специфичных клеток, способные элиминировать опухолевые клетки линии MCF-7.

Доказано, что в периферической крови больных HER2-позитивным раком молочной железы содержание цитотоксических Т-лимфоцитов, специфичных к эпитопам E75 и E88 антигена HER2/neu, значимо превышает таковое в периферической крови здоровых индивидов.

Доказано, что разработанный способ получения HER2-специфичных цитотоксических Т-лимфоцитов позволяет повысить содержание E75-специфичных Т-клеток в культуре мононуклеарных клеток периферической крови в среднем в 8 раз, содержание E88-специфичных Т-лимфоцитов – в среднем в 22 раза, при этом содержание CD8⁺ Т-лимфоцитов в выделенной популяции E88-специфичных клеток составляет порядка 71,5%, в выделенной популяции E75-специфичных клеток – порядка 90,2%.

Доказано, что дендритные клетки, трансфицированные ДНК-конструкцией, кодирующей иммуногенные эпитопы E75 и E88 опухоль-ассоциированного антигена HER2/neu, эффективно стимулируют формирование специфического цитотоксического Т-клеточного ответа *in vitro* против опухолевых клеток линии рака молочной железы MCF-7, экспрессирующих HER2/neu.

Доказано, что субпопуляционный состав E75- и E88-специфичных Т-лимфоцитов культуры мононуклеарных клеток периферической крови здоровых индивидов и аутологичных дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкцией, кодирующей эпитопы E75 и E88 антигена HER2/neu, характеризуется значительным содержанием (более 40%) Т-клеток памяти со

свойствами стволовых клеток и существенно меньшим содержанием наивных Т-клеток по сравнению с таковым в общей популяции не активированных *in vitro* CD8⁺ Т-лимфоцитов периферической крови.

Теоретическая значимость исследования обоснована следующими положениями:

Доказано, что стимуляция культуры мононуклеарных клеток периферической крови аутологичными дендритными клетками, трансфицированными ДНК-конструкцией, кодирующей эпитопы E75 и E88 белка HER2/neu, повышает содержание E75-специфичных и E88-специфичных Т-лимфоцитов и уровень их цитотоксичности против линии HER2-экспрессирующих опухолевых клеток.

Показано, что E75- и E88-специфичные цитотоксические Т-лимфоциты, активированные аутологичными дендритными клетками, трансфицированными ДНК-конструкцией, кодирующей эпитопы E75 и E88 белка HER2/neu, характеризуются низким содержанием наивных Т-лимфоцитов и высоким содержанием Т-клеток памяти со свойствами стволовых клеток.

Полученные результаты расширяют существующие представления о функционировании противоопухолевого антиген-специфического цитотоксического Т-клеточного иммунного ответа.

Применительно к проблематике диссертации:

Результативно использован комплекс существующих современных экспериментальных методик, включающих многоцветную проточную цитометрию с подбором восьмицветной панели моноклональных антител, методы магнитной трансфекции, электропорации и нуклеофекции клеток, технологию окрашивания антиген-специфичных CD8⁺ Т-лимфоцитов, магнитную сортировку антиген-специфичных клеток, выделение ДНК из лейкоцитов периферической крови человека, генотипирование клеток периферической крови и опухолевых клеточных линий человека по локусу HLA A, ОТ-ПЦР в режиме реального времени для оценки экспрессии гена *ErbB2* в клетках опухолевой линии, методы культивирования клеток.

Изложены результаты экспериментальных исследований, доказывающие, что дендритные клетки, генерированные из прилипающей фракции

моноклеарных клеток периферической крови условно-здоровых доноров и трансфицированные ДНК-конструкцией, кодирующей эпитопы белка HER2/neu, по фенотипическим и функциональным свойствам соответствуют зрелым антиген-презентирующим клеткам. Совместное культивирование с полученными описанным способом аутологичными зрелыми дендритными клетками приводит к значительному увеличению содержания HER2-специфичных цитотоксических Т-лимфоцитов в культуре моноклеарных клеток периферической крови условно-здоровых доноров.

Изучены фенотипические особенности HER2-специфичных цитотоксических Т-лимфоцитов, позволяющие оценить распределение субпопуляций Т-клеток памяти и эффекторных Т-лимфоцитов внутри популяций целевых антиген-специфичных клеток.

Доказано, что *in vitro*-генерированные предложенным в исследовании способом HER2-специфичные цитотоксические Т-лимфоциты характеризуются более высоким уровнем цитотоксичности в отношении опухолевых клеток молочной железы MCF-7 по сравнению с эффектом от общей фракции активированных моноклеарных клеток, а также по сравнению с цитотоксичностью общей популяции CD8⁺ Т-клеток.

Показано, что продукция IFN- γ имеет место при неспецифических реакциях Т-клеточного иммунного ответа, однако уровень продукции IFN- γ значимо выше при реализации специфической цитотоксической функции цитотоксическими Т-лимфоцитами, специфичными к антигену клетки-мишени.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики:

Разработан оригинальный протокол генерации популяций антиген-специфичных цитотоксических Т-клеток с цитотоксической активностью против опухолевых клеток, экспрессирующих специфический опухоль-ассоциированный антиген. По разработанному протоколу получен патент на изобретение «Способ получения *in vitro* популяций активированных антиген-специфичных противоопухолевых цитотоксических Т-лимфоцитов, специфичных к эпитопам опухоль-ассоциированного антигена».

Представлены новые научные результаты, которые могут стать основой для разработки современных подходов клеточной иммунотерапии рака молочной железы, в частности, разработки технологии получения антиген-специфичных цитотоксических Т-лимфоцитов для адоптивного Т-клеточного переноса в целях профилактики развития рецидивов и метастазирования у пациентов с HER2-позитивным раком молочной железы.

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 специфического цитотоксического противоопухолевого иммунного ответа против опухолевых клеток, экспрессирующих целевой антиген. 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 обзор и анализ имеющейся научной информации по теме исследования. Экспериментальная работа с нуклеиновыми кислотами, интактными клетками, клеточными линиями и культурами клеток выполнена лично автором и включала выделение моноклеарных клеток из периферической крови условно-здоровых доноров и больных раком молочной железы, генотипирование ДНК клеток периферической крови человека и клеток опухолевых линий человека, ведение клеточных линий злокачественных опухолей человека, культивирование моноклеарных клеток *in vitro* в присутствии и отсутствии различных групп праймированных зрелых дендритных клеток, окрашивание антиген-специфичных клеток по технологии стрептамеров и выделение их методом магнитной сортировки, культивирование выделенных антиген-специфичных клеток, исследование фенотипа и цитотоксической активности 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 непосредственно автором или при непосредственном участии автора.

На заседании 5 сентября 2019 года диссертационный совет принял решение присудить Кузнецовой М.С. ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 15 человек, из них 8 докторов наук по специальности 14.03.09 – «Клиническая иммунология, аллергология», участвовавших в заседании, из 21 человека, входящих в состав совета, проголосовали: за присуждение учёной степени 15, против присуждения учёной степени 0, недействительных бюллетеней 0.

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



Козлов В.А.

и.о. ученого секретаря
диссертационного совета, доктор
медицинских наук

Колесникова О.П.