



Федеральное государственное бюджетное
научное учреждение
«Научно-исследовательский институт
фундаментальной и клинической
иммунологии»
НИИФКИ

Ядринцевская, 14,
г. Новосибирск, 630099
телефон: (383) 222-26-74, факс: (383) 222-70-28
e-mail: info@niikim.ru
www.niikim.ru

«УТВЕРЖДАЮ»

И.о. директора Федерального
государственного
бюджетного научного учреждения
«Научно-исследовательский
институт фундаментальной
и клинической иммунологии»,
доктор биологических наук



А.Н. Силков

«21» августа 2026г

Отзыв ведущей организации Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» (НИИФКИ) о научно-практической значимости диссертационной работы Фёдоровой Полины Олеговны на тему: «Оптимизация метода обогащения и экспансии популяций натуральных киллеров и НКТ-клеток с возможностью последующей генетической модификации химерным рецептором CAR», представленной на соискание учёной степени кандидата медицинских наук по специальностям 3.2.7. Иммунология и 1.5.10. Вирусология в диссертационный совет ДСУ 24.1.173.01. созданный на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»

Актуальность темы диссертационной работы

Диссертация Фёдоровой П.О. посвящена оптимизации метода обогащения популяций НК- и НКТ-клеток и повышению эффективности генетической модификации лимфоцитов химерным рецептором CAR и является одним из самых значимых и актуальных направлений в современной иммунологии и онкоиммунологии.

Наряду с традиционными методами лечения онкологических заболеваний в настоящее время активно разрабатываются иммунотерапевтические подходы. Для борьбы с опухолевыми клетками первичного очага или отдаленных метастазов используются клетки иммунной системы, способные распознавать опухоль-специфические и опухоль-ассоциированные антигены и

реализовывать противоопухолевый иммунный ответ. Для этого проводится активация клеток-эффекторов и их генетическая модификация химерным рецептором антигена (CAR). CAR-T-терапия, при которой в качестве модифицированных клеток выступают Т-лимфоциты, совершила настоящий переворот в лечении В-клеточных лейкозов и лимфом, показав свою эффективность при лечении рецидивирующих или устойчивых к химиотерапии форм заболеваний.

Тем не менее, CAR-терапия не лишена недостатков, к которым относятся трудоемкий процесс получения CAR-клеток, высокая стоимость препарата, развитие тяжелых побочных реакции при введении пациенту CAR-T-клеточного продукта. Наиболее сложным этапом получения CAR-клеток является их генетическая модификация, а именно получение популяции клеток с высокой экспрессией CAR. Для снижения развития нежелательных побочных эффектов у пациентов, а также уменьшения стоимости лечения предлагается использование в качестве клеток-эффекторов НК- и/или НКТ-клеток. CAR-НК- и CAR-НКТ-клетки не требуют индивидуального, аутологичного процесса производства, а их инфузия не сопряжена с риском развития тяжелых побочных реакций.

Таким образом, тема диссертации Фёдоровой П.О. является крайне актуальной, работа представляет собой важное научное исследование, объединяющее теоретические и практические аспекты.

Соответствие темы диссертации с указанной специальностью

Тема диссертации соответствует п. 6 «Разработка и усовершенствование методов диагностики, лечения и профилактики инфекционных, аллергических и других иммунопатологических процессов», п. 7 «Разработка способов воздействия на иммунную систему с помощью фармакологических препаратов и методов иммунобиотерапии. Исследование эффективности и безопасности этих воздействий» паспорта специальности 3.2.7. Иммунология.

Соответствует п. 5 «Проблемы генной инженерии, использования вирусов как векторов для доставки ксеногенного и дополнительного генетического материала в восприимчивую клетку. Вирусы как инструмент генной терапии. Создание химерных вирусных частиц с заданными свойствами» паспорта специальности 1.5.10. Вирусология.

Связь работы с планом соответствующих отраслей науки и народного хозяйства

Диссертационное исследование «Оптимизация метода обогащения и экспансии популяций натуральных киллеров и НКТ-клеток с возможностью

последующей генетической модификации химерным рецептором CAR» полностью соответствует приоритетам государственной политики в области здравоохранения и науки, в частности – подпункту «в» п. 20 Перечня «Приоритеты и перспективы научно-технологического развития Российской Федерации», утвержденного Указом Президента РФ от 28.02.2024 г. № 145, где особое внимание уделяется персонализированной медицине.

Вышеуказанное исследование выполнено в соответствии с основными направлениями научных исследований, проводимых в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.М. Мечникова».

Новизна исследования и полученных результатов

Научная новизна исследования и полученных результатов заключается в следующем:

- В исследовании представлена подробная сравнительная характеристика первичных культур моноклеарных клеток периферической крови, которые были однократно активированы с помощью моноклональных антител к CD3-, CD28-рецепторам (МАТ), L-фитогемагглютинаина или Конканавалина А, проведена оценка влияния данных активаторов на пролиферацию НК- и НКТ-клеток. Был определен наиболее оптимальный вариант активации для обогащения НК- и НКТ-клеток в первичной культуре лимфоцитов.
- Изучена возможность применения фукозилированного хондроитинсульфата (FCS) для экспансии культивируемых НК- и НКТ-клеток, данное химическое соединение использовалось для выполнения поставленной задачи впервые.
- Предложен новый методический подход для экспансии НК- и НКТ-клеток, основанный на впервые доказанной эффективности применения опухолевой линии НЕК 293Т в качестве аллогенных фидерных клеток.

Значимость для науки и практики полученных автором результатов

Исследование, проведенное Фёдоровой П.О., обладает высокой значимостью как с научной, так и с практической точки зрения. Иммуностимулирующий эффект FCS открывает новые возможности для более детального изучения данного соединения и для его потенциального применения в качестве иммуномодулятора. Описанное в данной работе использование линии НЕК 293Т для активации НК- и НКТ-клеток является основой для создания нового, ранее не применяемого, лабораторного протокола для экспансии НК- и НКТ-клеток. Кроме того, в исследовании

описаны и подлежат сравнению различные подходы к созданию CAR-НК- и CAR-НКТ-клеток, что позволит в дальнейшем более эффективно осуществлять экспансию НК-клеток или НКТ-клеток.

Научно-практическая значимость данного исследования, позволила внедрить полученные результаты и сформулированные выводы в работу кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии им. академика А. А. Воробьева Института общественного здоровья им. Ф. Ф. Эрисмана ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) при изучении дисциплин микробиологии, вирусологии и иммунологии, читаемых студентам по направлениям подготовки «Лечебное дело», «Стоматология», «Медико-профилактическое дело», «Фармация», «Педиатрия».

Личный вклад автора

Личный вклад Фёдоровой П.О. заключается в непосредственном определении вектора исследования, проектировании его методологии, постановке цели и задач диссертационной работы. Все экспериментальные этапы работы, равно как и последующая обработка, графическое представление и трактовка эмпирических данных, реализованы автором самостоятельно. Соискатель лично подготовил серию научных публикаций по теме работы, представил основные результаты на тематических конференциях, обеспечил их апробацию, а также выполнил написание и техническое оформление текста диссертации и автореферата.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

Основные научные положения, результаты и практические рекомендации диссертации рекомендуется включить в образовательные программы и учебные курсы по иммунологии, онкологии и вирусологии в медицинских и биологических ВУЗах, использовать в практическом здравоохранении в отрасли персонализированной медицины, а также учитывать при разработке CAR-препарата на основе CAR-НК- и/или CAR-НКТ-клеток на стадиях доклинических и клинических испытаний.

Количество печатных работ

В рамках проведённого исследования автором опубликовано 14 научных работ, в том числе:

- 5 статей в изданиях, включенных в Перечень рецензируемых научных ВАК при Минобрнауки России;

- 3 статьи, включённые в международные базы данных Scopus, Web of Science, PubMed;
- 1 патент;
- 5 публикаций в сборниках материалов конференций.

Структура и содержание диссертации, ее завершенность

Диссертация представлена на 180 страницах машинописного текста и включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, представление результатов и их анализ, заключение, выводы, рекомендации для практического применения, а также списки сокращений и условных обозначений, перечень использованной литературы. В работе содержатся 13 таблиц, 16 иллюстраций и 3 приложения. Список литературы насчитывает 229 источников, среди которых 9 отечественных и 220 зарубежных.

Во **«Введении»** обоснована актуальность выбранной темы исследования, указана степень разработанности темы, определены цель и 5 задач диссертационной работы, выбраны методология и методы исследования, указаны личный вклад автора и степень достоверности и апробация результатов исследования. «Введение» содержит также положения, выносимые на защиту, которые отражают новизну, теоретическую и практическую значимость диссертационного исследования.

Глава 1 «Обзор литературы» представляет собой систематизированный обзор современных научных данных по тематике CAR-терапии. В обзоре литературы уделяется большое внимание преимуществам и недостаткам адоптивной иммунотерапии, строению CAR-рецептора, различным поколениям CAR, методам генетической модификации лимфоцитов и видам CAR-терапии. Автор обосновывает необходимость применения CAR-НК- и CAR-НКТ-терапии, указывает на недостаточность знаний в области разработки CAR-НК- и CAR-НКТ-продукта, описывает текущие ограничения технологии. Опираясь на анализ имеющейся литературы, Фёдорова П.О. формулирует основные подходы к экспансии CAR-НК- и CAR-НКТ-клеток, которые будут экспериментально исследованы в диссертационном исследовании.

Глава 2 «Материалы и методы» содержит информацию о материалах и методах, используемых для оптимизации метода обогащения популяций НК- и НКТ-клеток и для повышения эффективности лентивирусной трансдукции. Прежде всего дается характеристика используемых материалов (образцов периферической крови и лейкоцитаро-тромбоцитарного концентрата), приведены критерии включения и исключения для условно здоровых доноров-

добровольцев. Далее следует описание методов для получения лентивирусного вектора, культивирования первичных и опухолевых клеточных линий, оценки клеточных популяций.

После выделения моноклеарных клеток из донорского материала проводится первичная оценка их жизнеспособности, анализ фенотипа и цитотоксичности. Далее клетки активируют, после чего их трансдуцируют или длительно культивируют в присутствии интерлейкинов и/или фидерных клеток. Во время культивирования периодически оценивают деление и жизнеспособность клеточной популяции, а также исследуют эффекторную функцию и экспрессию различных маркеров. После трансдукции лимфоциты также подвергают длительному культивированию и определению их числа и экспрессии CAR-рецептора.

Глава 3 «Результаты и обсуждение» посвящена описанию экспериментально полученных результатов, их обсуждению и сравнению с данными, полученными другими исследовательскими группами и описанными в научных публикациях.

Поскольку в работе выделяется 4 вектора исследования, то глава 3 также содержит 4 подраздела, в начале каждого из которых представлен план проведенных экспериментов, изложенный как в текстовой форме, так и в виде графического изображения.

В первом подразделе определяется оптимальный набор интерлейкинов, периодически добавляемых в питательную среду при культивировании первичной культуры лимфоцитов. Согласно полученным результатам, из подлежащих к сравнению комбинаций цитокинов (ИЛ-2+ИЛ-15, ИЛ-2+ИЛ-15+ИЛ-21 или культивирование в присутствии только ИЛ-2) наибольшая экспансия CD3-CD56+НК-клеток и CD3+CD56+НКТ-клеток наблюдается при культивировании с добавлением ИЛ-2+ИЛ-15+ИЛ-21. В последующих экспериментах автор учитывает данный результат и культивирует лимфоциты в присутствии ИЛ-2, ИЛ-15 и ИЛ-21.

В следующей серии экспериментов оценивается влияние активаторов пролиферации нецитокинового происхождения на популяции НК- и НКТ-клеток. В качестве активаторов исследуются МАТ, L-фитогемагглютинин, Конканавалин А, и комбинация МАТ+FCS. Исходя из приведенных данных, самым предпочтительным способом активации первичной культуры является использование МАТ+FCS, так как при этом наблюдали наибольший прирост клеток, обладающих высокой цитотоксической активностью. Наибольшая пролиферация CD56+клеток также наблюдается при применении комбинации МАТ+FCS.

Далее автор исследует еще один подход к обогащению популяции НК-клеток – соинкубацию с фидерными клетками опухолевого происхождения. В качестве фидеров была выбрана эмбриональная культура клеток почек человека НЕК 293Т, а в качестве группы сравнения – клетки, активированные с помощью МАТ к CD3-, CD28-рецепторам. В целях оптимизации протокола использования фидерных клеток применялись 2 различных подхода: методы активации, включающие активацию при помощи МАТ и НЕК 293Т и метод активации при помощи только фидерных клеток НЕК 293Т. Было установлено, что при использовании НЕК 293Т в качестве фидерных клеток наблюдается выраженное возрастание доли НК- и НКТ-клеток, а подход с однократной соинкубацией с фидерами без использования МАТ оказался самым эффективным: уже на 4-й день после соинкубации доля CD56+лимфоцитов достигает 60% в первичной культуре лимфоцитов.

Последний, завершающий подраздел главы, отражает результаты по подбору условий для осуществления эффективной лентивирусной трансдукции с целью получения CAR-лимфоцитов. Здесь проводится анализ протоколов для трансфекции клеток НЕК 293Т и методик по концентрированию лентивирусов, оценивается эффективность лентивирусной трансдукции первичной культуры моноклеарных клеток и селекции полученных CAR-лимфоцитов. С целью повышения частоты встраивания CAR-генов в геном клеток первичной культуры лимфоцитов предлагается несколько подходов: использование клеточной сепарации с последующей трансдукцией смешанной фракции CD4+ и CD8+лимфоцитов (активация в данном случае проводится с помощью биodeградируемых наночастиц, конъюгированных с МАТ к CD3-, CD28-рецепторам) или трансдукция несепарированных клеток первичной культуры, но активированных различными способами. В качестве активаторов пролиферации для клеток без сепарации выступают используемые ранее МАТ, МАТ+FCS, L-фитогемагглютинин, Конканавалин А или НЕК 293Т (однократная соинкубация в начале культивирования). Наибольшая доля CAR-лимфоцитов наблюдается среди клеток, прошедших этапы магнитной сепарации и активации с помощью наночастиц. Показано, что повышение доли CAR-лимфоцитов в культуре возможно и в период после трансдукции, если проводится селекция CAR-лимфоцитов с помощью антибиотика бластицина, ген устойчивости к которому закодирован в плаزمиде, используемых для сборки вирусного вектора.

Таким образом, глава 3 представляет собой целостное, методологически обоснованное и детально проиллюстрированное изложение оригинальных

научных результатов, которые обладают несомненной научной новизной и практической значимостью.

На основании полученных данных было сформулировано 6 научных выводов, которые соответствуют поставленным целям и задачам диссертационного исследования. Эти выводы подкреплены результатами научного анализа и проверены современными методами статистической обработки данных. В заключении произведено обобщение всех ключевых результатов исследования.

Структура диссертации логична, последовательна и соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям. Все поставленные задачи решены, выводы обоснованы и подтверждены экспериментальными данными, работа является завершенным научным исследованием.

Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации

Диссертация Фёдоровой Полины Олеговны выполнена в соответствии с требованиями, предъявляемыми к написанию диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук в соответствии с разделом II «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 г. (со всеми дополнениями и изменениями в последующих редакциях).

Методология анализа и исследовательский дизайн являются актуальными и соответствуют целям и задачам работы, что свидетельствует о высокой зрелости исследовательского подхода. Достоверность и обоснованность полученных данных подтверждаются применением современных методов. Выводы, сделанные на основе полученных результатов, полностью соответствуют заявленным задачам исследования.

К незначительным недостаткам можно отнести наличие стилистических погрешностей и опечаток, которые не снижают научной ценности работы и могут быть легко устранены.

Вопросы, возникшие при ознакомлении с диссертацией:

1. Почему в данном исследовании для экспансии НК-клеток использовали МАТ к CD3-, CD28-рецепторам, если это активатор Т-клеток, которые, в свою очередь, являются конкурирующей популяцией для натуральных киллеров в первичной культуре лимфоцитов?
2. Чем обусловлен выбор режима длительного культивирования в течение 21 дня, имеется ли здесь научная новизна?
3. Насколько эффективно применение ИЛ-7 для экспансии НК или НКТ клеток по Вашим данным или данным литературы?

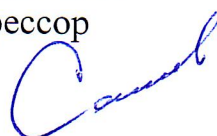
Заключение

Таким образом, диссертационная работа Фёдоровой Полины Олеговны на тему: «Оптимизация метода обогащения и экспансии популяций натуральных киллеров и НКТ-клеток с возможностью последующей генетической модификации химерным рецептором CAR» на соискание ученой степени кандидата медицинских наук является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение научной задачи – оптимизации метода обогащения популяций НК- и НКТ-клеток и повышения эффективности генетической модификации лимфоцитов химерным рецептором CAR, имеющей существенное значение для иммунологии и вирусологии, что соответствует требованиям п. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 г. со всеми дополнениями и изменениями в последующих редакциях, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор Фёдорова Полина Олеговна заслуживает присуждения искомой ученой степени по специальностям 3.2.7. Иммунология и 1.5.10. Вирусология.

Диссертационная работа, автореферат и отзыв обсуждены и одобрены на заседании Ученого совета Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» (протокол № 8 от 21 августа 2026 г.).

Заведующий лабораторией
молекулярной иммунологии НИИФКИ,
доктор медицинских наук, профессор

«21» августа 2026г.



Сергей Витальевич Сенников

Подпись С.В.Сенникова заверяю:
Учёный секретарь НИИФКИ, к.б.н.

«21» августа 2026г.



Елена Давидовна Гаврилова

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» (НИИФКИ). Адрес: 630099, Новосибирская обл., г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, дом 14, тел. +7(383) 222-26-74, официальный сайт: www.niikim.ru, e-mail: info@niikim.ru