

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора медицинских наук, профессора, заведующего научно-исследовательским отделом молекулярной биологии и экспериментальной терапии опухолей федерального государственного бюджетного учреждения «Российский научный центр рентгенорадиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации Боженко Владимира Константиновича на диссертационную работу Фёдоровой Полины Олеговны на тему: «Оптимизация метода обогащения и экспансии популяций натуральных киллеров и НКТ-клеток с возможностью последующей генетической модификации химерным рецептором CAR», представленную в диссертационный совет ДСУ 24.1.173.01 на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям 3.2.7. Иммунология и 1.5.10. Вирусология.

Актуальность темы диссертационной работы

Лечение злокачественных новообразований на поздних стадиях развития и рецидивирующих опухолей с использованием традиционных методов, таких как хирургия, радио- и химиотерапия, как правило, мало эффективно. Это стимулировало разработку новых подходов к терапии, одним из которых является адоптивная иммунотерапия на основе иммунных клеток, экспрессирующих химерные антигенные рецепторы (chimeric antigen receptor, CAR) заданной специфичности. Наиболее часто для получения CAR-клеток используют Т-лимфоциты, обладающие высокой цитотоксической активностью. Несмотря на эффективность лечения В-клеточных лимфом и лейкозов с помощью CAR-T-терапии, данный терапевтический подход не лишен трудностей при разработке продуктов для лечения солидных опухолей, содержащих CAR-T-клетки.

На сегодняшний день для повышения эффективности проводимой CAR-терапии разрабатываются инновационные стратегии, включающие получение мультитаргетных CAR-клеток, усовершенствование конструкций CAR, создание комбинированных подходов с ингибиторами контрольных точек и антиангиогенными средствами. Кроме того, на безопасность и

эффективность CAR-продуктов влияет и выбор клеток-эффекторов, поскольку они имеют биологические свойства, отличные от Т-лимфоцитов. Альтернативой Т-клеткам в контексте CAR-терапии исследуются натуральные киллеры, обладающие естественным противоопухолевым потенциалом и способностью к лизису клеток-мишеней несколькими механизмами, а также макрофаги имеющие большой потенциал, связанный как с собственными противоопухолевыми свойствами, так и с перспективами их генетической модификации.

Таким образом, тема диссертации Фёдоровой П.О., целью которой является оптимизация метода обогащения популяций НК- и НКТ-клеток и повышение эффективности генетической модификации лимфоцитов химерным рецептором CAR, представляется актуальной, так как посвящена наиболее разрабатываемому, в настоящее время, направлению оптимизации CAR-T терапии солидных опухолей.

Обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Диссертационная работа Федоровой П.О. представляет собой самостоятельное научное исследование, выполненное в соответствии с современными требованиями. В представленной работе автор грамотно сформулировала цель и задачи исследования исходя из комплексного изучения современной научной литературы по выбранной тематике. Дизайн исследования и используемые методы также были выбраны путем анализа подходов, используемых другими исследователями в данном направлении. Научные положения, выводы и рекомендации, сформулированные в диссертации, основаны на фактических данных, соответствуют поставленным целям и задачам и наглядно продемонстрированы в таблицах и рисунках.

Достоверность и новизна исследования, полученных результатов

Результаты исследования достоверны и обоснованы, что обеспечивается достаточным объемом материала и использованием современных

вирусологических и молекулярно-генетических (трансфекция, трансдукция), иммунологических (проточная цитометрия, цитотоксический тест) и молекулярно-клеточных (выделение клеток из биологического материала, оценка жизнеспособности, подсчет количества клеток, длительное культивирование) методов. Все полученные результаты проходили этап статистической обработки, сравнивались, анализировались и подлежали визуализации. Полученные данные хорошо согласуются с результатами, изложенными в научных публикациях о экспансии НК- и НКТ-клеток и о эффективности лентивирусной трансдукции, что подчеркивает их достоверность и придает работе высокий уровень академической значимости.

В данной работе впервые сравнивали подходы для активации и экспансии НК- и НКТ клеток, включающие использование провоспалительных цитокинов, активаторов пролиферации нецитокинового происхождения, а также аллогенных фидерных клеток. Было изучено иммуномодулирующее действие фукозилированного хондроитинсульфата (FCS) на моноцитарные клетки периферической крови человека в режиме длительного культивирования. В исследовании оценивали потенциал клеточной линии НЕК 293Т в качестве фидерных клеток для активации и обогащения популяций НК- и НКТ клеток.

Значимость для науки и практики полученных автором результатов

Результаты исследования обладают высокой теоретической и практической значимостью. Сравнение различных методов культивирования моноклеарных клеток периферической крови с целью получения обогащенных популяций НК- и НКТ-клеток показывает значительный потенциал для широкого внедрения в лабораторную практику, направленную на получение CAR-НК- и CAR-НКТ-клеток в количествах, достаточных для клинического применения.

Кроме того, в работе исследованы разные подходы к обогащению популяций НК- и НКТ-клеток с использованием клеточной линии НЕК 293Т и показан наиболее эффективный вариант из предложенных подходов.

Данный метод культивирования, ранее не используемый для обогащения НК- и НКТ-клеток, также представляет высокую ценность для науки и практики.

Материалы, изложенные в диссертационной работе Фёдоровой П.О., используются в учебном и научном процессе кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии им. акад. А.А. Воробьёва Института общественного здравоохранения им. Ф.Ф. Эрисмана ФГАОУ ВО Первого МГМУ им. И.М. Сеченова при изучении дисциплин микробиологии и иммунологии, читаемых студентам по направлениям подготовки 31.05.01 «Лечебное дело», 31.05.03 «Стоматология», 32.05.01 «Медико-профилактическое дело», 33.05.01 «Фармация», 31.05.02 «Педиатрия».

Соответствие диссертации паспорту специальности

Результаты проведенного исследования соответствуют п. 6 «Разработка и усовершенствование методов диагностики, лечения и профилактики инфекционных, аллергических и других иммунопатологических процессов» и 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. А также соответствуют 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.

Полнота освещения результатов диссертации в печати

По результатам исследования автором опубликовано 14 печатных работ, отражающих содержание диссертации, в том числе 2 оригинальные и 1 обзорная научные статьи в международных, зарубежных изданиях, индексируемых в базах данных Scopus и Web of Science, а также 4

оригинальные и 1 обзорная научные статьи в изданиях, включенных в Перечень ВАК при Минобрнауки России, и 5 публикации в сборниках материалов международных и всероссийских научных конференций. Материалы работы включены в патент №2813531 от 13.02.2024.

Содержание и оформление диссертационной работы

Содержание научно-квалификационной работы изложено логически, последовательно, имеется все необходимые разделы. Диссертационная работа изложена на 180 страницах машинописного текста и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и обсуждение, заключение, выводы, практические рекомендации, список сокращений и условных обозначений, список литературы, а также три приложения (приложение А, приложение Б, приложение В). Работа проиллюстрирована 16 рисунками, имеет 13 таблиц. Библиографический список состоит из 229 источников, из которых 9 отечественных и 220 зарубежных.

Во введении приведены сведения об актуальности данного исследования и степени разработанности темы исследования, сформулированы цель и задачи, подчеркнуты научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, представлены данные о личном вкладе автора и внедрении результатов исследования, вынесены основные положения диссертации.

Первая глава представляет собой обзор литературы, в котором последовательно описаны подходы к иммунотерапии онкологических заболеваний с акцентом на адоптивную терапию. Далее следует более подробное рассмотрение CAR-терапии, включающее строение CAR-рецептора, виды генетической модификации лимфоцитов и виды CAR-терапии. После описания видов CAR-терапии автор более детально раскрывает достоинства и текущие ограничения CAR-НК- и CAR-НКТ-терапии.

Во второй главе описана характеристика используемых материалов, приведены критерии включения и исключения для участников исследования, являющихся донорами цельной периферической крови или лейкоцитарно-тромбоцитарного концентрата. Далее автор дает общую характеристику используемых методов, а затем приводит исчерпывающее изложение всех применяемых методик. В работе использован комплекс современных молекулярно-биологических и иммунологических методов, а также методов работы с культурами клеток.

Третья глава диссертации «Результаты и обсуждение» содержит результаты научных экспериментов, которые были получены лично Фёдоровой П.О. В начале главы дается краткое описание проводимых экспериментов, исследование делится на обособленных 4 направления, каждое из которых при описании результатов выделяется автором в соответствующий подраздел.

В подразделе 3.1. определяется эффективная комбинация цитокинов для экспансии НК- и НКТ-клеток. Автор исследует такие провоспалительные цитокины, как ИЛ-2, ИЛ-15 и ИЛ-21, так как они, согласно литературным данным, чаще всего используются при культивировании НК-клеток. В работе цитокины изучаются в комбинациях ИЛ-2+ИЛ-15 и ИЛ-2+ИЛ-15+ИЛ-21, а в качестве группы контроля используются клетки, культивируемые в присутствии только ИЛ-2. Выявлено, что наибольшая экспансия НК- и НКТ-клеток наблюдается при культивировании с добавлением ИЛ-2+ИЛ-15+ИЛ-21.

Подраздел 3.2. описывает определение эффективного активатора пролиферации нецитокинового происхождения для экспансии НК- и НКТ-клеток. В качестве активаторов пролиферации были выбраны моноклональные антитела (МАТ) к CD3-, CD28-рецепторам, L-фитогемагглютинин, Конканавалин А. Кроме того, изучался потенциал иммуностимулирующего действия FCS, используемого для активации клеток в комбинации с МАТ к CD3- и CD28-рецепторам. Было установлено, что

наиболее подходящим способом для экспансии смешанной популяции НК- и НКТ-клеток является применение комбинации МАТ+FCS.

В подраздел 3.3. объединены опыты по оптимизации методики соинкубации МПК с фидерными клетками линии НЕК 293Т. Автором предложены 4 варианта соинкубации, из которых наиболее предпочтительным протоколом для экспансии НК- и НКТ-клеток среди рассматриваемых в работе является однократная активация клеточной линией НЕК 293Т без дополнительной активации с помощью МАТ к CD3- и CD28-рецепторам.

Последний подраздел «Результатов и обсуждения» содержит информацию о сравнении методик по созданию CAR-лимфоцитов с целью получения высокой экспрессии CAR-трансгена. Здесь анализируются различные подходы к получению лентивирусного вектора с высоким титром, токсичность полученного вирусодержащего материала, а также эффективность трансдукции в зависимости от способа активации первичной культуры лимфоцитов.

Таким образом, третья глава содержит логически последовательное и методологически выверенное описание результатов исследования. Полученные результаты сопоставлены с результатом ряда работ других исследователей, сопровождаются рисунками и таблицами.

В заключении автор на основании полученных результатов подводит итоги и формирует корректные и объективные выводы, которые соответствуют поставленным задачам. На основании полученных результатов сформулированы конкретные практические рекомендации. Полученные результаты обладают очевидной практической ценностью для сферы CAR-НК- и CAR-НКТ-терапии.

Соответствие содержания автореферата основным положениям и выводам диссертации

Содержание автореферата полностью соответствует тексту диссертационной работы Фёдоровой Полины Олеговны, адекватно раскрывая

наиболее подходящим способом для экспансии смешанной популяции НК- и НКТ-клеток является применение комбинации МАТ+FCS.

В подраздел 3.3. объединены опыты по оптимизации методики соинкубации МПК с фидерными клетками линии НЕК 293Т. Автором предложены 4 варианта соинкубации, из которых наиболее предпочтительным протоколом для экспансии НК- и НКТ-клеток среди рассматриваемых в работе является однократная активация клеточной линией НЕК 293Т без дополнительной активации с помощью МАТ к CD3- и CD28-рецепторам.

Последний подраздел «Результатов и обсуждения» содержит информацию о сравнении методик по созданию CAR-лимфоцитов с целью получения высокой экспрессии CAR-трансгена. Здесь анализируются различные подходы к получению лентивирусного вектора с высоким титром, токсичность полученного вируссодержащего материала, а также эффективность трансдукции в зависимости от способа активации первичной культуры лимфоцитов.

Таким образом, третья глава содержит логически последовательное и методологически выверенное описание результатов исследования. Полученные результаты сопоставлены с результатом ряда работ других исследователей, сопровождаются рисунками и таблицами.

В заключении автор на основании полученных результатов подводит итоги и формирует корректные и объективные выводы, которые соответствуют поставленным задачам. На основании полученных результатов сформулированы конкретные практические рекомендации. Полученные результаты обладают очевидной практической ценностью для сферы CAR-НК- и CAR-НКТ-терапии.

Соответствие содержания автореферата основным положениям и выводам диссертации

Содержание автореферата полностью соответствует тексту диссертационной работы Фёдоровой Полины Олеговны, адекватно раскрывая

её цель, задачи, методологию и ключевые выводы. Положения, выносимые на защиту, аргументированы, логически обоснованы и подтверждаются результатами экспериментов.

Замечания по содержанию и оформлению диссертации

В качестве замечаний по тексту диссертации могу отметить незначительные неточности оформительского характера. Также возникают дискуссионные вопросы:

1. Известно, что одной из проблем использования опухолевых линий в качестве фидерных клеток для НК-клеток является небезопасность получаемого клеточного продукта, который может содержать фрагменты фидерных клеток, их ДНК или даже сами клетки. Введение такого препарата пациенту с онкологическим заболеванием недопустимо. Как в дальнейшем вы планируете избавляться от клеток НЕК 293Т или их компонентов в клеточном продукте?
2. В диссертации не приводятся обоснования для использования FCS в комбинации с МАТ. Почему данное соединение не тестировали отдельно от других активаторов или в комбинациях с L-ФГА или КонаА?

Тем не менее, данные замечания и возникшие дискуссионные вопросы не влияют на общую позитивную оценку диссертационной работы.

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» является законченной, самостоятельной научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований осуществлено решение актуальной 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. Диссертация соответствует всем 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 диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор Фёдорова Полина Олеговна заслуживает присуждения искомой степени кандидата медицинских наук по специальностям 3.2.7. Иммунология и 1.5.10. Вирусология.

Официальный оппонент:

Доктор медицинских наук, профессор,
заведующий научно-исследовательским отделом молекулярной биологии и экспериментальной терапии опухолей в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Российский научный центр рентгенорадиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации
117997, г. Москва, ул. Профсоюзная, д. 86. Тел.: +7 (499) 120-65-10. E-mail: vbojenko@mail.ru


(подпись)

Боженко Владимир Константинович

Специальность: 3.1.6. Онкология, лучевая терапия (14.01.12. Онкология)

Согласен на обработку персональных данных.

1 сентября 2026 г.

Подпись д.м.н., профессора, заведующего научно-исследовательским отделом молекулярной биологии и экспериментальной терапии опухолей Боженко В.К. заверяю
ученый секретарь ФГБУ РНЦРР Минздрава России, д.м.н., профессор


(подпись)



Цаллагова З.С.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научный центр рентгенорадиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 117997, г. Москва, ул. Профсоюзная, д. 86, тел.: +7 (499) 120-65-10, e-mail: mailbox@rncrr.ru, сайт: <https://www.rncrr.ru/>