

ОТЗЫВ

**официального оппонента доктора медицинских наук, профессора
Носика Дмитрия Николаевича 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

Одна из наиболее важных проблем здравоохранения заключается в поиске новых эффективных подходов лечения онкологических заболеваний. Среди них разработка методов адаптивной клеточной терапии. В этом плане наиболее перспективным направлением можно считать модификацию иммунных клеток, обладающих природными противоопухолевыми цитотоксическими свойствами.

С этой целью используется биотехнологические методы получения иммунных клеток, несущих специфические химерные антигенные рецепторы (CAR) на поверхности натуральных киллеров и естественных Т-киллеров. Для этого широко используют ретровирусные или лентивирусные векторы. В результате получают клетки, нацеленные на определённые антигены на поверхности раковых клеток и способные избирательно их уничтожать. Важно, что этот подход исключает появление побочных явлений и цитотоксическое воздействие на нормальные клетки. При этом позволяет улучшить клинические показания при лечении пациентов с онкологическими заболеваниями.

Диссертация П. О. Фёдоровой посвящена разработке новых более совершенных методов лечения онкологических заболеваний на основе клеточной адаптивной терапии. Тема работы относится к отрасли персонализированной медицины и поэтому является несомненно актуальной.

Обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Автором грамотно спланирован и визуализирован дизайн исследования, ясно и четко сформулированы цель и задачи. В работе последовательно реализован комплексный подход к определению наиболее подходящего метода для обогащения НК- и НКТ-клеток, а также проанализированы факторы, влияющие на эффективность встраивания CAR-трансгенов. Выводы и рекомендации, а также каждое из четырех положений, вынесенных автором к защите, основаны на результатах, представленных в диссертации.

Достоверность и новизна исследования, полученных результатов

Достоверность полученных результатов обеспечена корректной статистической обработкой полученных данных, а также соответствием результатов имеющимся научным публикациям.

Научная новизна работы заключается в использовании фукозилированного хондроитинсульфата, который ранее не применялся для культивирования НК- и

НКТ-клеток. Кроме того, исходя из литературных данных, клеточная культура НЕК 293Т для стимуляции пролиферации НК- и НКТ-клеток была использована в данной работе впервые, впервые освещены различные подходы к *in vitro* обогащению популяций CAR-НК- и CAR-НКТ-клеток в их сравнительной характеристике и выбран протокол, объединяющий достоинства разных методик.

Значимость для науки и практики полученных автором результатов

Получение многочисленной популяции НК-клеток, обладающих высокой пролиферативной и цитотоксической активностью, является неотъемлемой частью разработки терапевтического подхода к лечению онкологических заболеваний с применением CAR-модифицированных лимфоцитов. Оптимизация методов культивирования НК- и НКТ-клеток – необходимый этап при разработке CAR-НК- и CAR-НКТ-клеток. Полученные данные могут использоваться при проведении последующих доклинических и клинических испытаний, а также могут быть применены для масштабирования производства CAR-НК-препарата, учитывая, что на данный момент в России не зарегистрировано ни одного отечественного препарата на основе CAR-НК- и/или CAR-НКТ-клеток.

Результаты исследования включены в патент №2813531 от 13.02.2024. Материалы диссертации используются в учебном и научном процессе кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии им. акад. А.А. Воробьева 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 полностью соответствуют:

- 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».

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

Работы, опубликованные соискателем, в полной мере излагают материал, представленный в диссертации. По результатам исследования автором опубликовано 14 печатных работ, включая 3 научные статьи в международных, зарубежных изданиях,

индексируемых в базах данных Scopus и Web of Science, и 5 научных статей в изданиях, включенных в Перечень ВАК. Результаты работы были представлены в форме научных докладов на всероссийских научных конференциях и на конференциях с международным участием. Материалы работы включены в патент №2813531 от 13.02.2024.

Содержание и оформление диссертационной работы

Структура диссертации соответствует требуемым стандартам, построена по классическому плану и включает следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и обсуждение, заключение, выводы, практические рекомендации, список условных сокращений и обозначений, приложения. Диссертация изложена на 180 страницах машинописного текста, включает 16 рисунков, 13 таблиц, 3 приложения и 229 ссылок на литературные источники, включая публикации последних лет.

Во «Введении» обоснована актуальность темы исследования, сформулированы цель и задачи, определена новизна и практическая значимость работы, описаны методы исследования, положения, выносимые на защиту, апробации результатов и личный вклад автора в работу.

В первой главе автор приводит обзор литературы (на 45 страницах), который состоит из 12 подразделов, имеет единую концепцию и общий план повествования. В «Обзоре литературы» достаточно подробно описан этап разработки клеточного продукта на основе CAR-клеток. Автор обоснованно указывает на нерешенные научные проблемы и дефицит знаний в некоторых аспектах CAR-терапии, а также сравнивает современные подходы к преодолению этих трудностей.

Во второй главе представлено описание методологии исследования. В работе использован широкий арсенал современных молекулярно-генетических, иммунологических и молекулярно-клеточных методов, в том числе: трансфекция клеток с целью получения лентивирусного вектора, концентрирование вируссодержащего материала и определение его титра, трансдукция, выделение моноклеарных клеток, магнитная сепарация, культивирование клеток, селекция CAR-клеток, проточная цитометрия и постановка цитотоксического теста. Для анализа полученных данных применены адекватные статистические методы анализа.

Третья глава посвящена результатам и обсуждениям научного исследования Фёдоровой П.О., поэтому представляет собой ключевой элемент диссертационной работы. В начале главы автор описывает стратегию экспериментов и делит работу на 4 независимых направления:

- Подбор комбинации цитокинов, приводящей к пролиферации НК- и НКТ-клеток;
- Определение эффективного активатора пролиферации нецитокинового происхождения для экспансии НК- и НКТ-клеток;
- Оптимизация методики соинкубации МПК с фидерными клетками линии НЕК 293Т;
- Сравнение методик для создания CAR-лимфоцитов с целью получения высокой экспрессии CAR-трансгена.

Подраздел 3.1. описывает действие ИЛ-2, ИЛ-2+ИЛ-15 и ИЛ-2+ИЛ-15+ИЛ-21 на НК- и НКТ-клетки при их добавлении в питательную среду при

культивировании моноклеарных клеток периферической крови (МПК). Сравнение проводится по следующим параметрам: динамика пролиферативной активности МПК, экспрессия активационных маркеров на поверхности клеток, соотношение популяций МПК, абсолютное число НК- и НКТ-клеток, а также цитотоксическая активность МПК. Определена наибольшая экспансия НК- и НКТ-клеток и самая высокая цитотоксическая активность МПК наблюдаются при культивировании с добавлением ИЛ-2+ИЛ-15+ИЛ-21.

В подразделе 3.2. изложена информация об эффекте моноклональных антител к CD3-, CD28-рецепторам (МАТ), L-фитогемагглютинаина, Конканавалина А и комбинации МАТ+фукозилированный хондроитинсульфат на первичную культуру МПК с целью определения эффективного активатора пролиферации НК- и НКТ-клеток. На первом этапе определяют рабочие концентрации анализируемых соединений исходя из пролиферативной активности клеток при разных концентрациях. Далее проводят сравнительный анализ тестируемых веществ по пролиферативной активности клеток на 3-й день после активации, экспрессии маркеров ранней активации, а также учитывают динамику пролиферативной активности МПК, экспрессию активационных маркеров на поверхности клеток, соотношение популяций МПК, абсолютное число НК- и НКТ-клеток и цитотоксическую активность МПК при длительном культивировании. Установлено, что наиболее подходящим способом активации МПК, вызывающим пролиферацию НК- и НКТ-клеток, является использование комбинации МАТ+фукозилированный хондроитинсульфат.

В подразделе 3.3. приведены результаты экспериментов с клеточной линией НЕК 293Т, используемой в роли фидерных клеток для активации НК- и НКТ-клеток. В качестве контроля для активации МПК применяют МАТ. Автор сравнивает несколько вариантов активации с использованием НЕК 293Т: активация с помощью МАТ с последующей активацией культурой НЕК 293Т на 8-й день культивирования; активация с помощью МАТ с последующей активацией культурой НЕК 293Т на 15-й день; активация с помощью МАТ с последующей активацией культурой НЕК 293Т на 8-й и 15-й день; активация только клеточной линией НЕК 293Т в начале культивирования. Хотя при активации без использования МАТ наблюдается самый невысокий прирост общего числа клеток первичной культуры МПК, данный способ является наиболее предпочтительным для экспансии НК- и НКТ-клеток среди рассматриваемых в подразделе.

В подразделе 3.4. представлена вирусологическая часть работы: подбор условий для осуществления эффективной лентивирусной трансдукции с целью получения CAR-лимфоцитов; сравнение протоколов для трансфекции клеток НЕК 293Т и методик по концентрированию лентивирусов; оценку эффективности лентивирусной трансдукции клеточной линии Jurkat и первичной культуры МПК. Здесь анализируются различные способы проведения трансфекции на культуре НЕК 293Т (с помощью кальций-фосфатного метода или липофектамина), проверяется функциональность вируса после разморозки, сравниваются методики для концентрирования лентивирусов (с использованием PEG8000 или полибрена), а также проверяется эффективность экспрессии CAR-трансгена после трансдукции МПК в зависимости от способа активации и анализируется возможность применения селекции CAR-клеток с помощью бластицидина.

Резюмируя содержание третьей главы, можно отметить, что в ней содержится детальное и методологически обоснованное изложение научных результатов автора,

которые сопоставлены с данными других исследовательских групп. Полученные результаты не только решают задачи исследования, но и закладывают основу для новых методов культивирования НК- и НКТ-клеток.

В «Заключении» автор анализирует все полученные результаты, обобщает полученные данные. Выводы исследования полностью доказаны фактическими данными и глубоким методологическим анализом. На основании проделанной работы автор предлагает конкретные практические рекомендации.

Соответствие содержания автореферата основным положениям и выводам диссертации

Структура и содержание автореферата отвечают установленным правилам, в полной мере отражают суть и основные выводы диссертационной работы П. О. Фёдоровой.

Замечания по содержанию и оформлению диссертации

Текст работы содержит единичные стилистические и пунктуационные неточности, которые имеют сугубо технический характер. Возможно, что при описании результатов в некоторых разделах часть текста можно было бы отразить в «Материалах и методах». В расшифровке сокращений отсутствует упоминание Т-натуральных киллеров, обозначаемое автором как НКТ. Нам кажется, логичнее было бы ввести сокращение этого типа клеток как ТНК, а не НКТ.

Эти замечания носят несущественный характер и не влияют на высокую научную и практическую ценность исследования. Критических замечаний к диссертации практически нет.

Однако при ознакомлении с работой возникли следующие дискуссионные вопросы:

1. Насколько использование лентивирусного вектора для доставки генов CAR безопасно и не приводит ли это к инсерционному мутагенезу?
2. Почему определение экспрессии CD16-CAR проводилось именно на 5-й день после трансдукции первичной культуры лимфоцитов?
3. В данной работе выбор исследуемых цитокинов проводился в результате анализа литературы по соответствующей тематике, выбор МАТ в качестве активатора пролиферации – тоже. Чем обусловлено изучение L-фитогемагглютинаина, Конканавалина А и фукозилированного хондроитинсульфата?

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», выполненная под руководством доктора медицинских наук Маркушина Станислава Георгиевича и кандидата биологических наук Чикилевой Ирины Олеговны, представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям «3.2.7. Иммунология» и «1.5.10. Вирусология» является законченной научно-квалификационной работой, выполненной на высоком методологическом уровне. Работа содержит научные результаты, имеющие важное значение для иммунологии и

вирусологии, в работе содержится решение научной задачи по оптимизации метода обогащения популяций НК- и НКТ-клеток и повышению эффективности генетической модификации лимфоцитов химерным рецептором CAR, 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 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 отделом молекулярной вирусологии и противовирусных препаратов,
заведующий лабораторией противовирусных и дезинфекционных средств «Института вирусологии имени Д.И.Ивановского», ведущий научный сотрудник в Федеральном государственном бюджетном учреждении "Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи" Министерства здравоохранения Российской Федерации
123098, г. Москва, ул. Гамалеи, дом 18. Тел.: +7 (499) 193-30-01. E-mail: dnnosik@yandex.ru

Носик Дмитрий Николаевич

(подпись)

Специальность: 1.5.10. Вирусология (03.00.06. Вирусология)

Согласен на обработку персональных данных.

10.08.2026г.

Подпись д.м.н., профессора, заведующего отделом молекулярной вирусологии и противовирусных препаратов, заведующего лабораторией противовирусных и дезинфекционных средств «Института вирусологии имени Д.И. Ивановского», ведущего научного сотрудника Носика Д.И. заверяю:

Ученый секретарь ФГБУ НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, к.б.н.

Сысолятина Е.В.

(подпись)

Федеральное государственное бюджетное учреждение "Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи" Министерства здравоохранения Российской Федерации, 123098, г. Москва, ул. Гамалеи, дом 18, тел.: +7 (499) 193-30-01, e-mail: info@gamaleya.org, сайт: https://gamaleya.org/