

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д001.001.01 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 17.01.2019 № 246

О присуждении Олейник Екатерине Александровне, гражданке Российской Федерации, ученой степени кандидата медицинских наук

Диссертация «Характеристика клеточного иммунного ответа, индуцированного дендритными клетками, нагруженными антигенами вируса гепатита С» по специальности 14.03.09 – «Клиническая иммунология, аллергология» принята к защите 30 октября 2018 года, протокол № 245, диссертационным советом Д001.001.01, созданным (НИИФКИ), почтовый индекс 630099, адрес организации: г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, дом 14, действующего на основании приказа № 714 от 02.11.2012 года.

Соискатель Олейник Екатерина Александровна, 1990 года рождения, в 2013 году окончила Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Новосибирский государственный медицинский университет».

В 2015 году окончила ординатуру по специальности 14.03.09 – «Клиническая иммунология, аллергология» на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» (НИИФКИ)

В 2018 году окончила аспирантуру Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» по специальности 14.03.09 – «Клиническая иммунология, аллергология».

Диссертация выполнена в лаборатории клеточной иммунотерапии клинического отдела НИИФКИ.

**Научный руководитель** - доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент Российской Академии наук, Черных Елена Рэмовна, заместитель директора по научной работе, заведующая лабораторией клеточной иммунотерапии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» (НИИФКИ).

**Официальные оппоненты:**

1. **Повещенко Ольга Владимировна**, доктор медицинских наук, доцент, заведующая лабораторией клеточных технологий «Научно-исследовательского института клинической и экспериментальной лимфологии», филиала Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики» Сибирского отделения Российской академии наук»

2. **Ширшев Сергей Викторович**, доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки Российской Федерации, заведующий лабораторией иммунорегуляции Института экологии и генетики микроорганизмов Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук

**Ведущая организация** – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (ИХБФМ СО РАН) в своем положительном заключении, подписанном Зенковой Мариной Аркадьевной, доктором биологических наук, профессором, заведующей лабораторией биохимии нуклеиновых кислот, указала, что в работе на основании полученных автором данных осуществлено решение актуальной задачи - продемонстрирована принципиальная возможность стимуляции антигенспецифического клеточного иммунитета с помощью интерферона - индуцированных дендритных клеток, нагруженных рекомбинантными Core и NS3 белками и охарактеризованы параметры клеточного иммунного ответа у больных хроническим гепатитом С. Выводы и рекомендации достаточно обоснованы. По



актуальности темы, объему проведенных исследований, научной и практической значимости полученных результатов диссертационная работа Олейник Е.А. полностью отвечает требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает искомой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.09 – Клиническая иммунология, аллергология.

Соискатель имеет 6 печатных работ, в том числе 3 статьи в научных журналах и изданиях, которые включены в перечень российских рецензируемых научных журналов и изданий для опубликования основных научных результатов диссертаций и 1 работу в зарубежном научном издании, входящим в международную базу цитирования Web of science, а также 1 патент на изобретение.

Наиболее значимые научные работы по теме диссертации:

1. Олейник Е.А., Леплина О.Ю., Тыринова Т.В., Тихонова М.А., Пыринова Г.Б., Останин А.А., Старостина Н.М., Черных Е.Р. Влияние рекомбинантных белков Core и NS3 вируса гепатита С на созревание и функции дендритных клеток, генерируемых *in vitro* в присутствии интерферона-альфа // Иммунология, 2016, Т. 37, № 5, С. 239-245.
2. Олейник Е.А., Леплина О.Ю., Останин А.А., Старостина Н.М., Черных Е.Р. Адаптивный Т-клеточный ответ в патогенезе вирусной инфекции, обусловленной вирусом гепатита С // Медицинская иммунология, 2016, Т. 18, № 4, С. 309-316.
3. Chernykh E, Leplina O, Oleynik E, Tyrinova T, Tikhonova M, Starostina N, Ostanin A. Immunotherapy with interferon- $\alpha$  induced dendritic cells for chronic HCV infection (the results of pilot clinical trial) – 2017- Immunologic Research (DOI: 10.1007/s12026-017-8967-2)
4. Черных Е.Р., Олейник Е.А., Леплина О.Ю., Тихонова М.А., Курочкина Ю.Д., Старостина Н.М., Останин А.А. Индукция Т-клеточного иммунного ответа у пациентов с хроническим гепатитом С на фоне иммунотерапии дендритными клетками // Медицинская иммунология 2017, Т19, С. 387-400.
5. Пат. 2637631 РФ. Способ иммунотерапии хронического вирусного гепатита С / Черных Е.Р., Леплина О.Ю., Старостина Н.М., Тыринова Т.В., Олейник Е.А., Останин А.А. - № 2016120503, заявл. 25.05.2016; опубл. 05.12.2017, Бюл. 34.

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 от:

1. Заведующего кафедрой клинической биохимии и лабораторной диагностики Федерального государственного бюджетного военного образовательного учреждения высшего образования «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации; главного специалиста Минобороны Российской Федерации по клинической лабораторной диагностике, доктора медицинских наук, профессора, члена-корреспондента Российской академии наук **Иванова Андрея Михайловича.**
2. Заведующего кафедрой иммунологии и аллергологии Федерального государственного бюджетного военного образовательного учреждения высшего образования Сибирского государственного медицинского университета Минздрава России, главного аллерголога-иммунолога Департамента здравоохранения администрации Томской области, доктора медицинских наук, профессора **Климова Владимира Васильевича.**
3. Руководителя научного направления Научно-исследовательского института медицинских проблем Севера – обособленного подразделения Федерального исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук», доктора медицинских наук, профессора **Смирновой Светланы Витальевны**

Во всех отзывах отмечается высокая актуальность темы диссертационного исследования, указывается, что результаты работы демонстрируют возможность индукции *in vitro* и *in vivo* антигенспецифического клеточного ответа с помощью дендритных клеток, генерируемых из моноцитов в присутствии интерферона-а и нагруженных усеченными рекомбинантными белками вируса гепатита С (HCV) -



Core (1-120) и NS3 (1192-1457) у больных хроническим гепатитом С. Все отзывы положительные, критических замечаний не содержат.

Выбор ведущей организации обосновывается тем, что Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (ИХБФМ СО РАН)» является одним из ведущих научных учреждений, осуществляющих исследования в области биотехнологий, клеточных технологий, и трансляционной медицины. В институте активно проводятся фундаментальные исследования по изучению молекулярных основ иммунитета, а также вирусных и бактериальных агентов в организме млекопитающих. Большое внимание уделяется фундаментальным исследованиям клеточных и молекулярных механизмов запуска иммунного ответа дендритными клетками, а также разработке новых клеточных технологий стимуляции иммунного ответа на основе дендритных клеток.

Выбор официального оппонента, доктора биологических наук, **О.В. Повещенко** обосновывается ее работами, посвященными разработке клеточных технологий на основе аутологичных клеток, а также исследованиям взаимосвязей между фенотипическими и функциональными параметрами клеточного препарата и показателями его клинической эффективности при различных патологических состояниях.

Выбор официального оппонента, доктора медицинских наук, профессора **С.В. Ширшева** обосновывается его исследованиями в области молекулярных механизмов регуляции дифференцировки и функциональной активности дендритных клеток, а также других типов иммунных клеток (натуральные киллерные клетки, регуляторные Т-клетки), вовлеченных в патогенез хронической вирусной инфекции.

**Диссертационный совет** отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований

**Разработана новая научная идея** об индукции HCV-специфического клеточного ответа с помощью дендритных клеток, генерируемых из моноцитов в присутствии интерферона- $\alpha$  (ИФН-ДК) и нагруженных усеченными фрагментами рекомбинантных HCV белков Core (1-120) и NS3 (1192-1457).



**Доказано** отсутствие ингибирующего действия рекомбинантных HCV белков Core (1-120) и NS3 (1192-1457) на созревание и функции ИФН-ДК.

**Доказана** способность ИФН-ДК серонегативных доноров и больных хроническим гепатитом С при нагрузке Core (1-120) и NS3 (1192-1457) белками индуцировать антигенспецифические клеточные реакции (пролиферацию, продукцию IFN- $\gamma$  и активацию цитотоксических Т-клеток) в культурах аутологических моноклеарных клеток.

В исследованиях *ex vivo* **доказана** возможность генерации HCV-специфического клеточного ответа у больных хроническим гепатитом С на фоне иммунотерапии ИФН-ДК, нагруженными рекомбинантными вирусными белками (ДК<sub>Core/NS3</sub>), который проявляется возрастанием пролиферации, продукции IFN- $\gamma$  и дегрануляции CD8<sup>+</sup> Т-клеток при стимуляции моноклеарных клеток Core и NS3 белками, однако не сопровождается усилением продукции Th2 (IL-4, IL-6) цитокинов и экспансией CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> регуляторных Т-клеток.

**Доказано, что** у больных хроническим гепатитом С на фоне иммунотерапии генерация Core- и NS3-специфических Т-клеток, отвечающих пролиферацией и дегрануляцией, опережает по времени появление IFN- $\gamma$  – продуцирующих клеток.

**Доказана** отрицательная корреляция между выраженностью NS3-специфического ответа (пролиферация, продукция IFN- $\gamma$ ) и репликацией вируса у больных хроническим гепатитом С после проведения иммунотерапии.

**Доказана** возможность индукции HCV-специфического иммунного ответа на фоне иммунотерапии ДК<sub>Core/NS3</sub> у пациентов с хроническим гепатитом С, получающих противовирусную терапию интерферонами и рибавирином.

**Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что на основе полученных результатов**

**Расширены** представления о влиянии HCV белков на дендритные клетки моноцитарного происхождения; способности ИФН-ДК индуцировать HCV-специфические клеточные реакции и особенностях индуцированного ДК<sub>Core/NS3</sub> иммунного ответа у больных хроническим гепатитом С.

**Выявлена** индивидуальная гетерогенность HCV-специфических ответов по типу клеточных реакций, их выраженности и устойчивости, указывающая на иммунопатогенетическую разнородность пациентов с хроническим гепатитом С.



**Показана** важная роль NS3-специфических Т-клеток в ограничении репликации вируса после проведения иммунотерапии у больных хроническим гепатитом С.

### **Применительно к проблематике диссертации**

**Результативно использован** комплекс современных экспериментальных методик, включающих проточную цитофлуориметрию, радиометрическую оценку пролиферативной активности, метод иммуноферментного анализа, методы сепарации и культивирования клеток.

**Изложены доказательства** индукции HCV-специфических клеточных реакций с помощью дендритных клеток, генерируемых из моноцитов в присутствии интерферона-α и нагруженных рекомбинантными белками Core (1-120) и NS3 (1192-1457) в культурах мононуклеарных клеток.

**Показан** стимулирующий эффект иммунотерапии дендритными клетками, нагруженными рекомбинантными белками Core (1-120) и NS3 (1192-1457) на HCV-специфический иммунный ответ у больных хроническим гепатитом С (усиление в динамике иммунотерапии пролиферации, продукции Th1 цитокинов и дегрануляции CD8<sup>+</sup>Т-клеток при стимуляции мононуклеарных клеток вирусными белками).

**Показана** возможность стимуляции с помощью ДК<sub>Core/NS3</sub> антиген-специфического клеточного ответа у больных хроническим гепатитом С на фоне приема противовирусных препаратов и возможность получения быстрого вирусологического ответа при комбинации иммунотерапии с противовирусной терапией.

**Значение полученных соискателем результатов исследования для практики** подтверждается разработкой нового метода иммунотерапии для усиления иммунного ответа у больных хроническим гепатитом С (патент РФ № 2637631 «Способ иммунотерапии хронического вирусного гепатита С» и обоснованием возможности применения данного подхода в виде монотерапии и в сочетании с противовирусными препаратами. Показано, что моноиммунотерапия дендритными клетками не вызывает серьезных и несерьезных нежелательных явлений или выраженных побочных эффектов и сопровождается усилением антигенспецифического иммунного ответа, выраженность которого (для NS3-специфического ответа) обратно коррелирует с репликацией вируса. При этом комбинация иммунотерапии с противовирусными препаратами позволяет снизить



уровень виремии в ранние сроки лечения у большинства пациентов.

**Оценка достоверности результатов исследования выявила,** что результаты получены с использованием сертифицированного оборудования и реагентов. Работа выполнена на высоком методическом уровне и достаточном по объему материале. Достоверность результатов определяется методически правильно построенным ходом исследования, использованием современных и адекватных методик сбора и статистической обработки исходной информации. Выводы основаны на фактических данных, вытекают из сути работы и отражают ее содержание.

**Личный вклад соискателя состоит** в непосредственном участии соискателя в разработке дизайна исследования, рекрутировании пациентов, сборе клинико-лабораторных данных и проведении иммунологических исследований. Исследования с сепарацией и культивированием клеток *in vitro* выполнены лично автором, проточная цитометрия проводилась с участием кандидата биологических наук М.А.Тихоновой, подбор больных – совместно с зав. отделением иммунологии клиники иммунопатологии НИИФКИ - кандидата медицинских наук Н.М. Старостиной. Статистическая обработка и интерпретация экспериментальных и клинических данных проведена лично автором. Подготовка основных публикаций по выполненной работе проведена при непосредственном участии автора.

Диссертация Олейник Е.А. «Характеристика клеточного иммунного ответа, индуцированного дендритными клетками, нагруженными антигенами вируса гепатита С» является научно-квалификационной работой, в которой решена актуальная научно-практическая задача – продемонстрирована принципиальная возможность стимуляции антигенспецифического клеточного ответа с помощью интерферон-а - индуцированных дендритных клеток, нагруженных рекомбинантными Core (1-120) и NS3 (1192-1457) белками и охарактеризованы параметры клеточного ответа, индуцированного дендритными клетками у больных хроническим гепатитом С. По актуальности, методическому уровню, новизне, теоретической и практической значимости представленная работа полностью отвечает требованиям «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013г. (с изменениями от 21.04.16. №335), предъявляемым к кандидатским диссертациям.



На заседании 17 января 2019 г диссертационный совет принял решение присудить Олейник Екатерине Александровне ученую степень кандидата медицинских наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 16 человек, из них 11 докторов наук по специальности 14.03.09 – «Клиническая иммунология, аллергология», участвовавших в заседании, из 21 человека, входящих в состав совета, проголосовали: за присуждение ученой степени - 16, против присуждения – 0, недействительных бюллетеней - 0.

Председатель

диссертационного совета,

доктор медицинских наук, профессор, академик РАМН Козлов В.А.



Ученый секретарь диссертационного совета,

кандидат медицинских наук

17 января 2019г.

Хантакова Ю.Н.