

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора биологических наук Хайдукова Сергея Валерьевича

на диссертационную работу Кузнецовой Марии Сергеевны «Фенотипические и функциональные характеристики *in vitro*-генерированных цитотоксических Т-лимфоцитов, специфичных к эпитопам антигена HER2/neu», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.03.09 – Клиническая иммунология, аллергология.

Диссертационная работа Кузнецовой М.С. посвящена разработке подхода к получению популяций цитотоксических Т-лимфоцитов, специфичных к эпитопам опухолевого антигена HER2/neu, и фенотипическому исследованию субпопуляционного состава данных клеток и оценке их функциональных свойств.

Актуальность исследования

Преимуществом иммунотерапии опухолевых заболеваний, по сравнению с базовыми методами лечения, такими как хирургия, лучевая и химиотерапия, является прежде всего существенно более низкая токсичность. Кроме того, базовые методы справляются с удалением основной опухолевой массы, но не способны полностью устранить минимальную опухолевую нагрузку, сохранение которой провоцирует развитие рецидивов и метастазирование. При этом, фундаментальные и клинические исследования последних лет подтверждают эффективность использования потенциала иммунной системы для устранения опухолевых клеток, распространенных в организме пациента и несущих на своей поверхности специфичные антигенные детерминанты. Многочисленные иммунотерапевтические подходы, направленные на борьбу с конкретными опухоль-ассоциированными антигенами, используют активированные антиген-специфичные цитотоксические Т-лимфоциты (ЦТЛ) в качестве основного противоопухолевого агента. Преимущество использования ЦТЛ в иммунотерапии связано с их выраженными цитотоксическими свойствами, а также тем фактом, что данные клетки могут нести фенотип клеток памяти, тем самым позволяя обеспечить стойкий, пролонгированный противоопухолевый иммунный ответ.

Современные методы многоцветной проточной цитометрии в сочетании с технологиями МНС-мультимеров позволяют осуществлять не только мечение, выделение и исследование функциональных особенностей

популяций CD8⁺ Т-клеток, но также исследование уровня дифференцировки и субпопуляционного состава популяций цитотоксических Т-лимфоцитов, специфичных к конкретным опухолевым антигенам.

Одним из широко исследуемых опухолевых антигенов является мембранный белок HER2/neu, гиперэкспрессия которого наблюдается при различных типах карцином, что делает его удобной мишенью для иммунотерапии. К настоящему моменту накоплено значительное количество исследований, разработан ряд антител и лекарственных препаратов, нацеленных на данный антиген. Однако, экспрессия HER2/neu продолжает быть ассоциирована с наиболее агрессивным течением заболевания, плохим клиническим прогнозом и ухудшением показателей выживаемости, в связи с чем исследование подходов, нацеленных на данный антиген, не теряют своей актуальности.

Все вышеперечисленное обуславливает актуальность разработки способа получения популяций HER2/neu-специфичных цитотоксических Т-лимфоцитов и исследование фенотипических особенностей, содержания субпопуляций клеток памяти и противоопухолевой цитотоксической активности данных клеток.

Научная новизна исследования

Научная новизна диссертационного исследования подтверждена получением Патента РФ и не вызывает сомнения. Разработан и оптимизирован протокол получения HER2-специфичных цитотоксических Т-лимфоцитов с использованием дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкцией, кодирующей эпитопы белка HER2/neu, а также технологии окрашивания, магнитной сортировки и последующей наработки антиген-специфичных Т-лимфоцитов. В ходе работы впервые проведено фенотипическое исследование распределения субпопуляций Т-клеток памяти внутри популяций HER2-специфичных цитотоксических Т-лимфоцитов, включая определение таких субпопуляций как наивные Т-лимфоциты, Т-клетки центральной памяти, Т-клетки эффекторной памяти, Т-клетки памяти со свойствами стволовых клеток и терминально-дифференцированные Т-лимфоциты. Продемонстрировано, что полученные E75- и E88-специфичные ЦТЛ более чем на 40% представлены Т-клетками памяти со свойствами стволовых клеток, способны проявлять более выраженную цитотоксичность и отличаются более высоким уровнем продукции IFN- γ в ответ на предъявление HER2-экспрессирующих опухолевых клеток, по сравнению с показателями цитотоксичности и продукции IFN- γ смешанной культуры

активированных моноклеарных клеток. Показано наличие HER2-специфичных Т-лимфоцитов в крови условно-здоровых доноров и значимое увеличение их количества в крови пациентов с HER2-гиперэкспрессирующим раком молочной железы в анамнезе.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 136 страницах и состоит из традиционных разделов – введения, обзора литературы, описания материалов и методов, главы, посвященной результатам собственного исследования, обсуждения результатов, заключения, выводов и списка литературы. Работа характеризуется последовательным и логичным изложением, содержит 4 таблицы и иллюстрируется 23 рисунками. В работе представлены сведения из 195 источника, большинство из которых – зарубежные публикации (178 источников).

Во введении автором четко сформулирована цель – исследование фенотипических и функциональных характеристик цитотоксических Т-лимфоцитов, специфичных к эпитопам E75 и E88 белка HER2/neu. Цель достигается посредством решения 4 задач, поставленных автором, выполнение которых последовательно описано в диссертации.

Обзор литературы состоит из 6 подглав, написан достаточно полно и демонстрирует хорошее владение теорией и глубокое понимание автором сути исследуемой научной проблемы. Описана роль клеточной иммунотерапии в борьбе с опухолевыми заболеваниями. Подробно охарактеризована иммунобиология ключевых клеточных агентов исследования – дендритных клеток и цитотоксических Т-лимфоцитов, представлены основные методы исследования антиген-специфичных Т-лимфоцитов и перечислены существующие гипотезы, характеризующие процессы дифференцировки и классификацию CD8⁺ Т-лимфоцитов.

Глава «Результаты собственных исследований» состоит из 4 разделов, расположенных в соответствии с очередностью выполнения поставленных задач.

Первый раздел «результатов» посвящен оценке содержания HER2-специфичных цитотоксических Т-лимфоцитов во фракции моноклеарных клеток периферической крови условно-здоровых доноров и пациентов с HER2-позитивным раком молочной железы, результаты которой позволяют сделать вывод, что повышенное содержание HER2-специфичных Т-клеток в крови пациентов по сравнению с таковым у здоровых доноров указывают на

наличие иммунной реакции, развивающейся в ответ на развитие HER2-ассоциированного злокачественного процесса, как предполагает автор в главе «Обсуждение результатов исследования».

Второй раздел главы «Результаты» автор описывает результаты разработки протокола получения HER2-специфичных цитотоксических Т-лимфоцитов, оптимизации его этапов и оценки их эффективности.

Третий раздел главы «Результаты» посвящен исследованию цитотоксической активности выделенных популяций HER2-специфичных цитотоксических Т-лимфоцитов. Следует отметить, что автор исследования не ограничивается исследованием уровня прямой цитотоксичности против HER2-экспрессирующих клеток опухолевой линии, но и определяет один из возможных механизмов реализации цитотоксичности в исследуемой культуре, связанный с повышением продукции IFN- γ . Выбор данного механизма реализации цитотоксического эффекта для исследования представляется весьма логичным, поскольку в исследовании показано, что активированные HER2-специфичные цитотоксические Т-лимфоциты в значительной степени представлены Т-клетками памяти со свойствами стволовых клеток, характерной для которых является продукция IFN- γ .

В последнем разделе результатов представлены данные по фенотипированию популяций HER2-специфичных цитотоксических Т-лимфоцитов и определению пяти основных субпопуляций циркулирующих Т-лимфоцитов, выделяемых в научной литературе: наивных Т-клеток, трех субпопуляций Т-клеток памяти, различающихся по уровню жизнеспособности и выраженности эффекторных свойств, и субпопуляции терминально-дифференцированных цитотоксических Т-лимфоцитов. Продемонстрированы отличия в паттернах распределения долей пяти исследуемых Т-клеточных субпопуляций, характерных для HER2-специфичных Т-клеток и для общей фракции всех CD8⁺ Т-клеток пробы. Также показано, что в общей фракции всех CD8⁺ Т-клеток происходит значимое снижение доли наивных Т-лимфоцитов в ответ на стимуляцию дендритными клетками, трансфицированными плазмидой, кодирующей эпитопы HER2/neu.

В главе «Обсуждение результатов исследования» автор последовательно обсуждает каждый раздел, представленный в результатах, обсуждая взаимосвязь полученных данных и сравнивая их с данными других современных исследований.

Работу завершают 5 выводов, которые вытекают непосредственно из представленных результатов и представлены в порядке, соответствующем очередности их выполнения и очередности поставленных задач. При этом первые 4 вывода отвечают на поставленные 4 задачи, а 5-тый вывод является обобщающим.

Работа содержит незначительное количество опечаток, не влияющее на понимание общего смысла текста. Все упомянутые замечания не снижают значимости работы и полученных результатов.

Достоверность и обоснованность полученных данных

Достоверность и обоснованность данных, полученных и описанных в главах «Материалы и методы исследования» и «Результаты собственного исследования», подтверждаются подробным описанием объектов исследования, дизайна работы, тщательным и корректным описанием используемых методов и оптимизированных протоколов, а также приведенным описанием статистических методов, использованных для подсчета данных.

Результаты диссертации получены лично автором работы, доложены и обсуждены на всероссийских и международных научных конференциях. По теме диссертации опубликовано 13 работ, в том числе 4 публикации в изданиях, рекомендованных ВАК, 1 патент.

Теоретическая и практическая значимость

Научная значимость работы обусловлена полученными данными о эффекторных функциях исследуемых HER2-специфичных цитотоксических Т-лимфоцитов, выражаемых в уровне прямой цитотоксичности и продукции IFN- γ против линии HER2-экспрессирующих опухолевых клеток человека, а также о распределении субпопуляций циркулирующих Т-клеток памяти и цитотоксических Т-лимфоцитов в популяциях HER2-специфичных цитотоксических Т-лимфоцитов.

Практическая значимость исследования связана с разработкой протокола получения HER2-специфичных Т-клеток. Автор отмечает, что исследование проведено на первичных культурах моноклеарных клеток периферической крови человека с использованием реактивов и технологии выделения антиген-специфичных клеток, разрешенных для клинического использования, в связи с чем протокол может быть в дальнейшем использован для проведения адоптивной Т-клеточной иммунотерапии

пациентов с HER2-позитивными злокачественными новообразованиями с высоким риском развития рецидивов после удаления основной опухолевой нагрузки.

Заключение

Принимая во внимание все изложенное выше, можно заключить, что исследование Кузнецовой М.С. является законченной научной квалификационной работой, соответствует всем требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, согласно п. 9 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года (с изменениями Постановлений Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 года № 335, от 02 августа 2016 года № 748, от 29 мая 2017 года № 650, от 28 августа 2017 года № 1024 «О внесении изменений в Положение о присуждении ученых степеней»), а ее автор несомненно заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология.

Официальный оппонент,
доктор биологических наук,

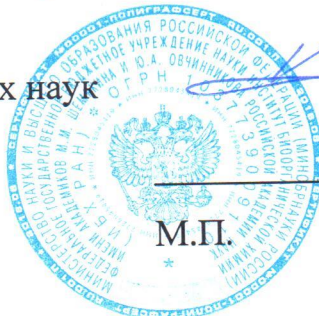
С.В. Хайдуков

старший научный сотрудник
лаборатории углеводов
Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
Институт биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и
Ю.А. Овчинникова Российской
Академии Наук (ИБХ РАН)

Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук защищена по специальностям 14.00.46 – клиническая лабораторная диагностика, 14.00.36 – аллергология и иммунология

Подпись С.В. Хайдукова заверяю:
Ученый секретарь ИБХ РАН,

доктор физико-математических наук



М.П.

В.А. Олейников