

УТВЕРЖДАЮ



Директор Федерального государственного  
бюджетного учреждения  
«Государственный научный центр  
«Институт иммунологии» Федерального  
медико-биологического агентства,  
академик РАН, доктор медицинских наук,  
профессор \_\_\_\_\_ М.Р. Хаитов

« 28 » \_\_\_\_\_ 01 2026 г.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Федерального государственного бюджетного учреждения  
«Государственный научный центр «Институт иммунологии»  
Федерального медико-биологического агентства

о диссертационной работе Ушаковой Е. И.

«Экспериментальная иммунотерапия злокачественного новообразования  
путем перепрограммирования миелоидных клеток в модели  
метастатической карциномы у лабораторных мышей»  
на соискание ученой степени кандидата биологических наук  
по специальности «3.2.7. Иммунология»

Диссертация «Экспериментальная иммунотерапия злокачественного новообразования путем перепрограммирования миелоидных клеток в модели метастатической карциномы у лабораторных мышей» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности «3.2.7. Иммунология» выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства (ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России).

Соискатель Ушакова Екатерина Игоревна, 12 августа 1995 года рождения, гражданство Российской Федерации, в 2019 году с отличием

окончила магистратуру биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» (МГУ имени М.В. Ломоносова). С 2019 по 2023 года обучалась в очной аспирантуре по специальности «Иммунология» на кафедре иммунологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. В период подготовки диссертации соискатель работала в ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России в должности младшего научного сотрудника.

**Научный руководитель** – доктор медицинских наук, профессор Атауллаханов Равшан Иноятович, заведующий отделом иммунной биотехнологии ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России.

**Слушали:**

1. Выступление Ушаковой Е.И. об основных результатах диссертационной работы.
2. Выступление рецензента доктора биологических наук Николаевой И. А.
3. Выступление рецензента кандидата биологических наук Никольского А. А.

По результатам рассмотрения диссертации принято следующее

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ:**

**Актуальность исследования**

Диссертация Ушаковой Е.И. «Экспериментальная иммунотерапия злокачественного новообразования путем перепрограммирования миелоидных клеток в модели метастатической карциномы у лабораторных мышей» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности «3.2.7. Иммунология» посвящена изучению механизмов и

эффективности противоопухолевого действия экспериментальной иммунотерапии метастатической солидной опухоли путем перепрограммирования миелоидных клеток агонистами TLR.

Иммunosupрессивные свойства среды внутри опухоли создаются как злокачественными, так и незлокачественными клетками, а также веществами, которые они вырабатывают. Значительную роль в иммуносупрессии играют миелоидные клетки: ассоциированные с опухолью макрофаги, внутриопухолевые дендритные клетки, привлеченные опухолью миелоидные супрессоры. Эти клетки производят растворимые ингибиторы иммунных реакций, такие как IDO, TGF $\beta$ , IL-10, простагландины, а также экспонируют на своей поверхности молекулы, обладающие способностью подавлять активность клеток иммунитета, в частности молекулы PD-L1 и PD-L2, вызывающие функциональный паралич и гибель Т-клеток. Не преодолев супрессию иммунитета, нельзя достичь эффективной элиминации злокачественных клеток силами иммунных механизмов. Поэтому исследование лечебного действия препаратов, которые могут перепрограммировать иммунные клетки внутри опухоли в противоопухолевый фенотип, а также могут преодолеть иммуносупрессивные механизмы и индуцировать адаптивные иммунные реакции, представляет актуальный подход в онкоиммунологии.

Новый подход в иммунотерапии основан на возможности перепрограммирования тканевых макрофагов и дендритных клеток в противоопухолевый фенотип. Изменение функционального состояния этих клеток достигается воздействием фармакологическими агентами, действующими через рецепторы врожденного иммунитета – Toll-подобные рецепторы 3 и 4 типов (TLR3 и TLR4, соответственно). Перепрограммирование переводит миелоидные клетки из состояния, способствующего прогрессивному росту опухоли, в состояние активной противоопухолевой защиты.

Диссертационная работа Ушаковой Екатерины Игоревны актуальна, поскольку посвящена разработке нового подхода к лечению метастатической солидной опухоли путем перепрограммирования миелоидных клеток агонистами TLR, а также исследованию детальных механизмов противоопухолевой иммунной защиты. Точное знание механизмов, понимание совокупности интегральных эффектов агонистов TLR могут составить основу для разработки новых методов терапии онкологических заболеваний.

### **Соответствие темы диссертации указанной специальности**

Тема диссертации полностью соответствует паспорту научной специальности «3.2.7. Иммунология» (Направления исследований: №2 Изучение механизмов врожденного и адаптивного иммунитета в норме и при патологии; №3 Изучение молекулярных и клеточных основ противобактериальной, противовирусной, противоопухолевой, противогрибковой, противопаразитарной, иммунной защиты; №6 Разработка и усовершенствование методов диагностики, лечения и профилактики инфекционных, аллергических и других иммунопатологических процессов).

### **Степень разработанности темы исследования**

Диссертационная работа посвящена исследованию иммунологических механизмов действия и эффективности новой экспериментальной иммунотерапии при злокачественном опухолевом процессе у лабораторных животных. Новый иммунотерапевтический подход состоит в перепрограммировании тканевых макрофагов и дендритных клеток в противоопухолевый фенотип. Изменение функционального состояния этих клеток происходит под влиянием

фармакологических агентов, действующих через рецепторы врожденного иммунитета – Toll-подобные рецепторы 3 и 4 типов.

Ранее коллективом авторов лаборатории активации иммунитета ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России был накоплен значительный объем данных, касающихся действия агонистов TLR3 и TLR4 на макрофаги и дендритные клетки в условиях культуры клеток *in vitro*. Было показано, что агонисты TLR3 и TLR4 индуцируют включение транскрипционной программы, характерной для M1-макрофагов и D1-дендритных клеток. Без воздействия агонистами TLR макрофаги и дендритные клетки стимулируют размножение клеток опухолевых линий в совместной культуре *in vitro*. После активации TLR-агонистами перепрограммированные макрофаги и дендритные клетки не только не стимулируют размножение опухолевых клеток, но, напротив, быстро и эффективно способствуют их гибели.

Несмотря на существенный прогресс в понимании эффектов TLR-агонистов на макрофаги и дендритные клетки, а также TLR-активированных макрофагов и дендритных клеток на клетки опухолевых линий в условиях культуры клеток *in vitro*, до диссертационной работы Е.И. Ушаковой не было изучено применение перепрограммирования макрофагов и дендритных клеток с помощью агонистов TLR3 и TLR4 на развитие злокачественной опухоли и противоопухолевых иммунных реакций в условиях организма *in vivo*.

### **Цель исследования**

Изучить механизмы и эффективность противоопухолевого действия экспериментальной иммунотерапии метастатической карциномы 4Т1 путём перепрограммирования миелоидных клеток агонистами Toll-подобных рецепторов.

### **Задачи исследования**

1. В экспериментальной модели карциномы 4T1 у мышей исследовать динамические характеристики роста и метастазирования опухоли и детально описать клеточный состав иммунного микроокружения опухоли и органов-мишеней метастазирования.

2. Оценить влияние агонистов TLR3 и TLR4 на рост карциномы 4T1 и на выживаемость мышей-опухоленосителей.

3. Изучить эффективность лечения метастатической карциномы 4T1 у мышей путем перепрограммирования миелоидных клеток агонистами TLR3 и TLR4 после хирургической резекции первичной опухоли.

4. Исследовать динамику противоопухолевых иммунных реакций у мышей с карциномой 4T1 в процессе иммунотерапии после хирургического удаления опухоли.

5. Исследовать эффективность формирования долговременной Т-клеточной иммунной памяти у мышей с карциномой 4T1, выживших после проведения экспериментальной иммунотерапии путем перепрограммирования миелоидных клеток агонистами TLR после хирургической резекции первичной опухоли.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Перепрограммирование миелоидных клеток агонистами TLR3 и TLR4 в противоопухолевый фенотип после хирургической резекции первичной карциномы 4T1 способствует усилению противоопухолевых адаптивных иммунных реакций.

2. Перепрограммирование миелоидных клеток агонистами TLR индуцирует формирование долговременной иммунной памяти, специфичной к антигенам опухоли.

3. Экспериментальная иммунотерапия путем перепрограммирования миелоидных клеток агонистами TLR3 и TLR4 после хирургической резекции первичной опухоли высокоэффективна для лечения солидной злокачественной метастатической карциномы 4T1 у мышей BALB/c.

### **Связь темы диссертации с планом научно-исследовательских работ ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России**

Диссертационная работа Ушаковой Е.И. выполнена в соответствии с планами научно-исследовательских работ, проводимых ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, в рамках государственного задания ФМБА «Разработка методов активации клеток-киллеров врожденного противоопухолевого иммунитета», шифр «Иммунитет-16» и была поддержана грантом РНФ «In situ терапевтическая вакцинация против злокачественной опухоли» (Соглашение 20-15-00391).

Тема диссертации была утверждена на заседании секции №1 Ученого совета ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России (протокол №3 от 19.06.2025 г.).

### **Основные результаты диссертационной работы**

Отработана экспериментальная модель метастатического рака молочной железы 4T1 у лабораторных мышей BALB/c, когда первичную опухоль удаляли, а затем проводили курс иммунотерапии. В этой экспериментальной модели исследована терапевтическая эффективность агонистов TLR3 и TLR4 для лечения летальной метастатической болезни после хирургической резекции первичной опухоли. Оптимизированы дозы и схема введения агонистов TLR3 и TLR4 и их комбинация с целью достижения максимального эффекта иммунотерапии. Исследовано влияние лечения агонистами TLR на различные звенья иммунитета: в частности, на

содержание CD3-, CD4-, CD8-T-клеток, НК-клеток, В-клеток, различных типов миелоидных клеток в дренирующих опухоль лимфатических узлах и селезенке.

Подробно описан состав клеток иммунной системы, инфильтрирующих ткань легких, куда диссеминируют многочисленные метастазы опухоли. Кроме того, исследована способность TLR-активированных макрофагов и дендритных клеток ткани легкого проявлять цитотоксическую активность в отношении клеток карциномы 4Т1.

Установлено, что экспериментальная иммунотерапия путем перепрограммирования агонистами TLR3 и TLR4 после хирургической резекции опухоли приводит к полному излечению 50% мышей от абсолютно летальной метастатической болезни. Показано, что комбинированное лечение, включающее хирургическую резекцию опухоли и введение агонистов TLR3 и TLR4, приводит к полной элиминации метастатических единиц в легких или к значительному снижению их количества. Доказано, что перепрограммирование макрофагов и дендритных клеток в ткани легких переводит эти клетки в противоопухолевое состояние с высоким уровнем цитотоксической активности в отношении клеток карциномы 4Т1.

Перепрограммирование миелоидных клеток агонистами TLR3 и TLR4 способствует значительной стимуляции адаптивных иммунных реакций Т-клеток и продукции антител против опухолевых антигенов. Изучение противоопухолевых адаптивных иммунных реакций показало, что применение агонистов TLR3 и TLR4 после хирургической резекции первичной солидной опухоли способствует увеличению количества Т-клеток памяти, реагирующих продукцией интерферона- $\gamma$  (ИФН- $\gamma$ ) на реактивацию антигенами карциномы 4Т1, увеличению содержания Т-клеток-эффекторов, секретирующих ИФН- $\gamma$ , а также повышению в крови

концентрации IgG-антител, специфичных к антигенам клеток карциномы 4T1.

Полученные в диссертации данные, несомненно, доказывают эффективность разработанного подхода в лечении летального метастатического рака молочной железы. Более того, установлена природа клеток, оказывающих прямое противоопухолевое цитотоксическое действие. Так, показано, что в модели метастатической карциномы 4T1 молочной железы у мышей BALB/c основными клетками, проявляющими противоопухолевую цитотоксичность, являются макрофаги и дендритные клетки, активированные TLR-агонистами.

В диссертационной работе исследованы механизмы формирования долговременной иммунной памяти у животных, выживших после проведения комбинированного хирургического лечения и иммунотерапии агонистами TLR3 и TLR4. У выживших мышей (в соответствии с международной терминологией – “complete responders”) обнаружено отсутствие роста или замедленный рост вторичных опухолей, инициированных повторной инокуляцией клеток карциномы 4T1. Детальный анализ показал, что замедленный рост вторичных опухолей сопровождался индукцией интенсивных противоопухолевых иммунных реакций. В дренирующих лимфатических узлах и в селезенке значительно повышалось содержание Т-клеток. Вторичные опухоли были интенсивно инфильтрированы цитотоксическими CD8-Т-клетками, специфично подавляющими рост клеток карциномы 4T1, а также опухолеспецифическими CD4- и CD8-Т-клетками памяти, секретирующими ИФН- $\gamma$  при реактивации антигенами карциномы 4T1 *ex vivo*. Миелоидные клетки в ткани вторичной опухоли были поляризованы в противоопухолевое состояние. Макрофаги, дендритные клетки, моноциты были активированы, в них активировалась транскрипция генов *Nos2*, *Il1b*, *Tnf* клетки приобретали выраженную противоопухолевую цитотоксическую

активность. Накопленные диссертантом факты свидетельствуют, что у ответчиков на терапию формировались долговременная иммунная память и резистентность к повторной инокуляции (рецидиву) опухоли.

Исследование механизмов гуморального ответа показало, что у контрольных животных с прогрессивно растущей карциномой 4Т1 практически не образуются противоопухолевые антитела. Напротив, после комбинированного лечения методом хирургического удаления первичной опухоли с последующей иммунотерапией агонистами TLR3 и TLR4 происходит значительная стимуляция продукции противоопухолевых антител к антигенам злокачественных клеток карциномы 4Т1. Эти интересные наблюдения автора говорят о том, что разработанный диссертантом подход к лечению метастатической карциномы не только перепрограммирует макрофаги и дендритные клетки в противоопухолевое состояние, но и индуцирует интенсивные адаптивные иммунные реакции против опухоли, в частности, реакцию CD4-, CD8-Т-клеток, секретирующих ИФН- $\gamma$ , и активацию цитотоксических CD8-Т-клеток, продукцию противоопухолевых антител, а также формирование длительной иммунной памяти, специфичной в отношении карциномы 4Т1.

### **Достоверность результатов диссертационной работы**

Достоверность результатов диссертационной работы обусловлена применением современного оборудования, прошедшего своевременную поверку, использованием сертифицированных методик, достаточным объемом экспериментальных данных и корректным применением статистических методов, адекватных поставленным задачам. Установлено, что результаты диссертационной работы являются достоверными.

### **Научная новизна работы**

Впервые системно исследованы врожденные и адаптивные иммунные реакции против опухоли в условиях комбинированного лечения путем хирургической резекции первичной опухоли и перепрограммирования миелоидных клеток агонистами TLR3 и TLR4.

Впервые показано, что инъекции TLR3 и TLR4 агонистов после хирургической резекции первичной опухоли 4T1 активируют противоопухолевые реакции CD4- и CD8-Т-клеток в дренирующих лимфатических узлах и в селезенке.

Впервые показано, что инъекции агонистов TLR3 и TLR4 перепрограммируют тканевые макрофаги и дендритные клетки (в частности, макрофаги и дендритные клетки в ткани легкого) в клетки с выраженной противоопухолевой цитотоксической активностью в отношении злокачественных клеток опухоли.

Впервые показано, что применение агонистов TLR3 и TLR4 после хирургической резекции первичной опухоли 4T1 способствует формированию долговременной иммунной памяти в виде долгоживущих CD4- и CD8-Т-клеток памяти, а также В-клеток памяти, продуцирующих IgG-антитела.

### **Теоретическая значимость работы**

Теоретическая значимость исследования заключается в получении новых знаний о биологических механизмах действия агонистов TLR3 и TLR4 на клеточное и гуморальное звенья противоопухолевого иммунитета. Установлено, что агонисты TLR способствуют индукции противоопухолевых Т-клеток и IgG-антител, специфичных к антигенам опухоли.

Полученные результаты исследований расширяют современные представления об участии миелоидных клеток в противоопухолевом иммунном ответе. Показано, что у мышей, получивших агонисты TLR,

иммунном ответе. Показано, что у мышей, получивших агонисты TLR, тканевые макрофаги и дендритные клетки приобретают свойства цитотоксических клеток, элиминируют метастазы злокачественной опухоли. При индукции рецидива миелоидные клетки внутри опухоли поляризованы в противоопухолевое состояние, что подтверждается усиленной экспрессией мРНК генов *Nos2*, *Il1b* и *Tnf*.

Теоретическую ценность представляют и новые сведения о возможности индукции долговременной Т-клеточной и В-клеточной иммунной памяти против опухоли не через прямое воздействие на лимфоидные клетки, а путем перепрограммирования макрофагов и дендритных клеток с помощью агонистов TLR3 и TLR4.

### **Научно-практическая значимость работы**

Научно-практическая значимость работы обусловлена разработкой и экспериментальным обоснованием нового подхода к лечению солидных злокачественных метастатических опухолей, основанного на комбинировании перепрограммирования миелоидных клеток агонистами TLR4 и TLR3 и хирургической резекции первичной опухоли. В экспериментальной модели солидной злокачественной метастатической карциномы 4T1 у мышей BALB/c разработанный в данной диссертационной работе подход к лечению приводил к выживаемости 50% животных. Установлено, что применение системной иммунотерапии агонистами TLR после хирургической резекцией первичной опухоли приводит к достоверному снижению числа метастатических очагов в лёгких, а в ряде случаев — к полному устранению метастатической болезни. Ключевым преимуществом предложенной комбинации является усиление как локального, так и системного противоопухолевого иммунитета за счет активации врожденного и адаптивного иммунного ответа, что позволяет

рассматривать данный подход как перспективную стратегию послеоперационной иммунотерапии.

Полученные результаты имеют практическое значение для разработки комбинированных схем лечения метастатических опухолей, направленных не только на удаление первичного опухолевого очага, но и на формирование длительного системного иммунного контроля над остаточными опухолевыми клетками и микрометастазами. Предложенный подход может быть использован в качестве экспериментальной платформы для оценки эффективности новых иммуномодулирующих препаратов, а также для оптимизации режимов их применения после хирургического вмешательства.

Исследование противоопухолевых свойств тканевых макрофагов и дендритных клеток открывает новые перспективы применения агонистов TLR в онкоиммунологии. Полученные данные свидетельствуют о том, что *in vivo* активированные миелоидные клетки проявляют цитотоксическую активность в отношении опухолевых клеток в метастатических очагах, подчеркивая потенциал агонистов TLR в качестве средств послеоперационной иммунотерапии. Это создаёт экспериментальную и концептуальную основу для моделирования иммунного микроокружения в метастатических нишах, где эффективность традиционных терапевтических подходов остаётся ограниченной.

Полученные данные о формировании долговременной Т-клеточной иммунной памяти имеют прикладное значение для разработки критериев оценки эффективности иммунотерапии. Они могут быть использованы для мониторинга иммунного статуса и прогнозирования риска развития рецидивов опухоли при отсутствии устойчивого противоопухолевого иммунного ответа. Данный подход особенно актуален для доклинических исследований, в рамках которых такие иммунологические параметры могут

служить надёжными биомаркерами эффективности экспериментальных противоопухолевых препаратов и терапевтических стратегий.

Разработанная методика оценки единичных антиген-специфичных CD4- и CD8-T-клеток памяти представляет собой точную, воспроизводимую и информативную систему анализа противоопухолевых иммунных реакций. Методика стандартизирована и применима как в доклинических моделях, так и при анализе клинических образцов, что делает её перспективным инструментом для оценки иммунного ответа у пациентов со злокачественными новообразованиями и разработки персонализированных иммунотерапевтических подходов. В диссертационной работе приведены детальные протоколы её реализации, включая алгоритмы анализа данных, что обеспечивает возможность внедрения методики в научно-исследовательские лаборатории.

Полученные в работе данные о клеточном составе иммунного инфильтрата опухолевой ткани и органов-мишеней метастазирования имеют практическую значимость для разработки и оптимизации иммунотерапевтических стратегий, направленных на снижение уровня иммуносупрессии как в опухолевом микроокружении, так и на системном уровне. Эти результаты могут быть использованы при формировании комплексных подходов к коррекции иммунного ответа в условиях прогрессирования и рецидива злокачественных новообразований.

В диссертационной работе показана перспективность трансляции в клиническую онкологию результатов иммунотерапии с использованием агонистов TLR3 и TLR4. Об этом свидетельствуют представленные в диссертации результаты экспериментов *in vitro*, демонстрирующие, что перепрограммирование моноцитарных макрофагов и дендритных клеток человека с помощью агонистов TLR3 и TLR4 приводит к формированию клеток с выраженной противоопухолевой цитотоксической активностью. Полученные результаты создают основу для дальнейшей разработки

иммуномодулирующих терапевтических подходов, направленных на повышение эффективности существующих методов иммунотерапии онкологических заболеваний.

Таким образом, выполненное исследование расширяет представление о возможностях иммунотерапии, направленной на миелоидные клетки опухолевого микроокружения. Агонисты TLR3 и TLR4 демонстрируют потенциал в качестве перспективных средств комбинированной терапии метастатических форм рака.

### **Практические рекомендации**

1. Для оценки содержания противоопухолевых IgG-антител рекомендуется применять сочетание двух методов: проточную цитофлуориметрию для анализа антител к поверхностным антигенам клеток опухоли и иммуноферментный анализ для измерения концентрации антител к внутриклеточным антигенам опухоли.
2. При оценке эффективности новых экспериментальных способов терапии солидной злокачественной метастатической карциномы 4T1 у мышей BALB/c рекомендуется рассматривать применение иммунотерапевтических подходов в качестве дополнения к хирургической резекции первичной опухоли.
3. Для увеличения интенсивности иммунных реакций антиген-специфических Т-клеток рекомендуется использовать агонист TLR4 в качестве молекулярного адъюванта.
4. Для перепрограммирования миелоидных клеток в противоопухолевое состояние *in vivo* рекомендуется применять агонисты TLR3 и TLR4 в составе иммунотерапевтических схем, с подбором оптимальных доз и режимов введения в зависимости от используемой экспериментальной модели.

### **Внедрение результатов исследования в практику**

Результаты диссертационной работы используются в экспериментальной практике в лаборатории активации иммунитета, лаборатории иммунохимии, лаборатории противовирусного иммунитета ФГБУ «ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России для разработки новых терапевтических подходов для анализа активности иммунных реакций против антигенов опухолей с целью преодоления иммуносупрессии при онкологических заболеваниях (акт внедрения от 20 июня 2020 г. и акт внедрения от 20 февраля 2023 г.).

### **Перспективы дальнейшей разработки темы**

Разработка терапевтических схем, включающих таргетированную активацию TLR-сигналинга и других путей врождённого иммунного ответа, представляет собой перспективное направление для клинической трансляции подходов, основанных на перепрограммировании миелоидных клеток. В ближайшей перспективе это открывает возможность рационального конструирования комбинаций с иммунными чекпойнт-ингибиторами, таргетными ингибиторами и стандартной химио- и лучевой терапией для усиления противоопухолевого иммунного ответа. Отдельный интерес представляет интеграция стратегий перепрограммирования клеток врожденного иммунитета с персонализированными противоопухолевыми вакцинами и генно-модифицированными клетками (CAR-T-клетки, CAR-NK-клетки и др.), подготовленными *ex vivo* для терапии пациентов с онкологическими заболеваниями. Разработка комплексных протоколов лечения, включающих перепрограммирование миелоидных клеток, может стать значимым этапом в создании эффективных персонализированных стратегий лечения злокачественных новообразований.

## **Полнота изложения материалов диссертации в опубликованных работах**

По основным материалам диссертационной работы опубликовано 15 печатных работ, из них 7 статей в научных журналах, которые включены в перечень рецензируемых периодических научных изданий, рекомендованных для публикации основных научных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук и доктора наук; 8 публикаций в материалах конгрессов и конференций.

### **Список статей, опубликованных по теме диссертации:**

1. **Ушакова Е.И.** Комбинированная иммунотерапия метастатической карциномы у лабораторных мышей путем резекции первичного опухолевого узла и последующего перепрограммирования макрофагов и дендритных клеток с помощью агониста TLR4 / **Е.И. Ушакова**, Е.С. Лебедева, А.В. Багаев, А.В. Пичугин, Р.И. Атауллаханов. – Текст: непосредственный // Иммунология. – 2021. – Т. 42. – №5. – С. 490–501. DOI: 10.33029/0206-4952-2021-42-5-490-501
2. Багаев А.В. Синергизм агонистов TLR3 и TLR4 при перепрограммировании макрофагов в противоопухолевое состояние / А.В. Багаев, А.С. Рыбинец, А.А. Федорова, **Е.И. Ушакова**, Е.С. Лебедева, А.В. Пичугин, Р.И. Атауллаханов. – Текст: непосредственный // Иммунология. – 2021. – Т. 42. - №6. – С. 615–630. DOI: 10.33029/0206-4952-2021-42-6-615-630
3. Атауллаханов Р.И. Перепрограммирование миелоидных клеток опухолевого микроокружения – новый подход в иммунотерапии злокачественных новообразований / Р.И. Атауллаханов, **Е.И. Ушакова**, С.А. Аль Худур, А.В. Пичугин, Е.С. Лебедева. – Текст: непосредственный // Иммунология. – 2022. – Т. 43. - №4. – С. 375–388. DOI: 10.33029/0206-4952-2022-43-4-375-388

4. **Ушакова Е.И.** Иммуногенность мультиантигенной вакцины, приготовленной из лизата злокачественных клеток опухоли / **Е.И. Ушакова**, А.А. Федорова, Е.С. Лебедева, А.В. Пичугин, Р.И. Атауллаханов. – Текст: непосредственный // Иммунология. – 2022. – Т. 43. - №4. – С. 389–400. DOI: 10.33029/0206-4952-2022-43-4-389-400

5. Пичугин А.В. Перепрограммирование миелоидных клеток опухолевого микроокружения повышает эффективность блокады рецепторов CTLA-4 и PD-1 при иммунотерапии злокачественной меланомы в эксперименте / А.В. Пичугин, С.А. Подсвинова, **Е.И. Ушакова**, Д.М. Спиринов, Е.С. Лебедева, Р.И. Атауллаханов. – Текст: непосредственный // Иммунология. – 2022. – Т. 43. - №6. - С. 673–690. DOI: 10.33029/0206-4952-2022-43-6-673-690

6. **Ушакова Е.И.** Интенсивность противоопухолевых иммунных реакций на иммунизацию вакцинами Multivac против карциномы 4Т1 у мышей BALB/с и меланомы В16 у мышей С57BL/6J не зависит от генотипа «хозяина» и тканевой природы опухоли / **Е.И. Ушакова**, А.В. Пичугин, А.А. Федорова, Е.С. Лебедева Р.И. Атауллаханов. – Текст: непосредственный // Иммунология. – 2022. – Т. 43. - №6. - С. 691–701. DOI: 10.33029/0206-4952-2022-43-6-691-701

7. Ataullakhanov R.I. Study of the antigenic specificity of T-cell immune reactions in response to immunization of laboratory mice with a recombinant adenoviral vector encoding the Spike-protein of SARS-CoV-2 / R.I. Ataullakhanov, **E.I. Ushakova**, A.V. Pichugin, E.S. Lebedeva, S.V. Ivanov, T.A. Ozharovskaia, O. Popova, D.N. Shcherbinin, A.S. Bandelyuk, O.V. Zubkova, M.M. Shmarov., D. Yu. Logunov, B.S. Naroditsky, A.L. Gintsburg. – Текст: непосредственный // Иммунология. – 2024. – Т. 45. - №1. - С. 33–49. DOI: 10.33029/1816-2134-2024-45-1-33-49

**Публикации в материалах научных конгрессов и конференций:**

1. Ushakova, E. I. CD4+ and CD8+ T lymphocytes protect mice treated with TLR4 agonist after resection of the primary tumor from metastatic 4T1 breast cancer / **E. I. Ushakova**. – Текст: непосредственный // Abstract book the 26<sup>th</sup> International Student Congress Of (bio)Medical Sciences (Groningen, Netherlands, 3-7 Jule 2019). – Netherlands, Groningen, 2019. – P. 339.

2. In situ anti-tumor immunization using the tumor microenvironment reprogramming with a TLR4-agonist induces strong CD4 and CD8 T cells responses, long-living T cell memory, and protection against 4T1 metastatic breast cancer in mice / **E. Ushakova**, M. Savchenko, E. Lebedeva, A. Pichugin, R. Ataulakhanov. – Текст: непосредственный // European Journal of Immunology. - 2021. – Vol. 51, Suppl. 1: Abstract 6<sup>th</sup> European Congress of Immunology (Location Virtual, September 1-4, 2021.). – P. 391. - P-0822.

3. Successful immunotherapy of the breast cancer metastatic disease in mice using a pharmaceutical TLR4-agonist induces systemic anti-tumor T cell response and long-term T cell memory / **E. Ushakova**, E. Lebedeva, A. Pichugin, R. Ataulakhanov. – Текст: непосредственный // Journal for ImmunoTherapy of Cancer. – 2021. – Vol. 9, Suppl. 1: Abstract the 8<sup>th</sup> Leading International Cancer Immunotherapy Conference in Europe (Virtual Conference, 8–9 October 2021). – A26. - P08.04.

4. Иммуногенность и противоопухолевая активность неоантигенной вакцины на основе рекомбинантного аденовирусного вектора в модели меланомы B16F10 у мышей / **Е. И. Ушакова**, Е. С. Лебедева, А. А. Федорова, А. В. Пичугин, Ф. Е. Френкель, М. М. Шмаров, Р. И. Атауллаханов. – Текст: непосредственный // Материалы III Объединенного научного форума физиологов, биохимиков и молекулярных биологов (Сочи, Россия, 3–8 октября 2021). Т. 2. – Москва: Перо, 2021. – С. 274.

5. Neoantigenic versus multi-antigenic personalized B16 melanoma vaccine comparison according to anti-tumor T cell response intensity / **E. Ushakova**, A. Fedorova, E. Lebedeva, A. Pichugin, R. Ataulakhanov. – Текст: непосредственный // Journal for ImmunoTherapy of Cancer. – 2022. – Vol. 10, Suppl. 1: Abstract 9<sup>th</sup> Immunotherapy of Cancer Conference (September 22–24, 2022 – Munich, Germany). – P03.08.

6. High immunogenicity of a personalized antitumor vaccine made from 4T1 breast carcinoma tissue and molecular adjuvants that reprogram dendritic cells and myeloid suppressors / **E. Ushakova**, E. Lebedeva, A. Fedorova, A. Pichugin, R. Ataulakhanov. – Текст: непосредственный // Abstract book 3<sup>rd</sup> Immuno-Oncology World Congress (Copenhagen, Denmark, 2-3 November 2022). – Denmark, Copenhagen, 2022. – P-166.

7. A personalized multi-antigenic tumor vaccine induces significantly stronger CD4 and CD8 T cell immune responses against B16 melanoma than the adenovirus vector-based vaccine encoding B16 neo-antigens / **E. Ushakova**, E. Lebedeva, A. Fedorova, A. Pichugin, R. Ataulakhanov. – Текст: непосредственный // Abstract book 3<sup>rd</sup> Immuno-Oncology World Congress (Copenhagen, Denmark, 2-3 November 2022). – Denmark, Copenhagen, 2022. – P-171.

8. Comparison of immunogenicity and effectiveness of multi-antigen and neo-antigen personalized cancer vaccines / **E. Ushakova**, A. Fedorova, E. Lebedeva, A. Pichugin, M. Shmarov, R. Ataulakhanov. – Текст: непосредственный // Abstract book 1<sup>st</sup> International Caparica Conference on Prescriptomics & Precision Medicine (Lisbon, Portugal, 11-13 May 2024). - Portugal, Lisbon, 2024. – P. 86.

**Материалы диссертационной работы были доложены и обсуждены на:**

1. The 26<sup>th</sup> International Student Congress Of (bio)Medical Sciences (ISCOMS) (Гронинген, Голландия, 3–7 июня 2019 г.);
2. 6<sup>th</sup> European Congress of Immunology (ECI) (Белград, Сербия, 1-4 сентября 2021 г.);
3. The 8<sup>th</sup> Immunotherapy of Cancer Conference (Мюнхен, Германия, 8–9 октября 2021 г.);
4. II Объединенном научном форуме физиологов, биохимиков и молекулярных биологов (Сочи, Дагомыс, 3–8 октября 2021 г.);
5. The 9<sup>th</sup> Immunotherapy of Cancer Conference (ITOS) (Мюнхен, Германия, 22-24 сентября 2022 г.);
6. The 3<sup>rd</sup> Immuno-Oncology World Congress (Копенгаген, Дания, 2-3 ноября 2023 г.);
7. 1<sup>st</sup> International Caparica Conference on Prescriptomics & Precision Medicine (Лиссабон, Португалия, 11-13 мая 2024 г.).

**Секция Ученого совета отмечает, что на основании  
выполненных соискателем исследований:**

- разработана новая научная идея, расширяющая представления о роли перепрограммирования миелоидных клеток агонистами TLR в реактивации противоопухолевых Т- и В-клеточных иммунных реакций;
- предложена оригинальная научная гипотеза о перепрограммировании тканевых макрофагов и дендритных клеток с приобретением ими прямого цитотоксического действия в органах-мишенях метастазирования;
- доказана перспективность использования комбинации агонистов TLR3 и TLR4 для индукции опухоль-специфических IgG-антител у мышей со злокачественной карциномой 4Т1;

– введен эффективный экспериментальный подход комбинированного лечения злокачественной карциномы 4T1, обеспечивающий выживаемость 50% мышей.

**Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:**

- доказана способность агонистов TLR3 и TLR4 индуцировать формирование долговременной иммунной памяти на антигены опухоли в дренирующих лимфатических узлах и в селезенке;
- применительно к проблематике диссертации эффективно использован комплекс существующих базовых методов исследования для анализа цитотоксических свойств CD8-T-клеток и миелоидных клеток из ткани опухоли и легких в отношении карциномы 4T1;
- изложены теоретические представления о возможном участии CD4-T-клеток, секретирующих ИФН- $\gamma$ , в формировании противоопухолевого иммунного ответа на антигены карциномы 4T1 у мышей, получавших лечение агонистами TLR при индукции рецидива злокачественной опухоли;
- раскрыты фенотипические и функциональные особенности тканевых макрофагов и дендритных клеток, проявляющих цитотоксическую активность в отношении клеток карциномы 4T1, уточняющие существующие представления об их роли в микроокружении органов-мишеней метастазирования;
- изучены особенности и закономерности перестройки клеточного состава иммунного микроокружения органов-мишеней метастазирования при индукции рецидива злокачественной опухоли в условиях противоопухолевой терапии;
- проведена модернизация экспериментальных моделей для изучения противоопухолевых иммунных реакций, обеспечивающая получение новых данных по роли перепрограммирования миелоидных клеток в ткани

опухоли и периферических тканях, а также уточнение подходов к анализу антиген-специфических антител на основе оценки их связывания с поверхностными антигенами клеток 4Т1.

**Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:**

- разработана и внедрена в лабораторную практику методика оценки противоопухолевого иммунного ответа, адаптированная для исследования Т-клеток-эффекторов и Т-клеток памяти;
- определены перспективы использования экспериментальной иммунотерапии путем перепрограммирования миелоидных после хирургического удаления опухоли для лечения злокачественной метастатической карциномы 4Т1 у мышей BALB/с;
- создана система практических рекомендаций для активации перепрограммирования макрофагов и дендритных клеток для индукции эффективного противоопухолевого Т- и В-клеточного иммунного ответа;
- представлены рекомендации по использованию агонистов TLR для активации моноцитарных макрофагов и дендритных клеток человека с целью превращения их в эффективные противоопухолевые клетки с цитотоксической активностью.

**Оценка достоверности результатов исследования выявила:**

- результаты получены на сертифицированном и откалиброванном оборудовании, эксперименты проведены по стандартизованным методикам, показана воспроизводимость результатов исследований в различных условиях;

- теория построена на известных, проверяемых фактах и согласуется с общепринятыми представлениями о миелоидных клетках и противоопухолевом иммунном ответе;
- идея базируется на обобщении передового опыта автора и других исследователей по рассматриваемой тематике, как отечественных, так и зарубежных исследований;
- использовано сравнение авторских данных и данных, полученных ранее по рассматриваемой тематике, как отечественных, так и зарубежных исследований;
- установлено качественное и количественное совпадение авторских результатов с результатами, представленными в независимых источниках по данной тематике;
- использованы современные методы сбора и обработки исходной информации, а также адекватные статистические методы исследования.

**Личный вклад соискателя состоит в** непосредственном участии во всех этапах выполнения диссертационного исследования: постановке и проведении экспериментов, получении исходных данных, разработке экспериментальных моделей и методик, обработке и интерпретации результатов, а также подготовке основных публикаций по выполненной работе.

**Соответствие диссертации предъявляемым требованиям и рекомендация к защите**

Диссертация Ушаковой Е.И. «Экспериментальная иммунотерапия злокачественного новообразования путем перепрограммирования миелоидных клеток в модели метастатической карциномы у лабораторных мышей» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности «3.2.7. Иммунология» охватывает основные вопросы

поставленной научной задачи и соответствует критерию внутреннего единства, что подтверждается наличием соответствующего методологически обоснованного плана научного исследования, основной идейной линией, концептуальностью и взаимосвязью выводов.

Диссертационная работа изложена на 182 страницах машинописного текста, включает 7 таблиц и 33 рисунка. Диссертационная работа написана в традиционном стиле и включает в себя следующие разделы: «Список сокращений», «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты исследований», «Обсуждение результатов», «Заключение», «Выводы», «Список литературы». Библиография включает 179 источников, в том числе, 21 отечественный источник и 158 иностранных источников.

Положительная оценка диссертации вытекает из ее актуальности, достоверности полученных данных, их научной новизны, теоретической и научно-практической значимости, обоснованности выводов.

**Исходя из вышеперечисленного, постановили:**

Диссертационная работа Ушаковой Е.И. «Экспериментальная иммунотерапия злокачественного новообразования путем перепрограммирования миелоидных клеток в модели метастатической карциномы у лабораторных мышей» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности «3.2.7. Иммунология» является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальных научных задач, имеющих значение для иммунологии: выявлены новые данные о перепрограммировании тканевых макрофагов и дендритных клеток, которые приобретают способность оказывать цитотоксическое действие на метастатические клетки карциномы 4Т1; исследованы особенности формирования долговременной иммунной памяти, специфичной к антигенам опухоли 4Т1 в модели рецидива злокачественного новообразования; доказана перспективность

