

«УТВЕРЖДАЮ»

Проректор по научной работе

ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова

Минздрава России

Д. б. н., профессор РАН Д.В. Ребриков



« 15 » 10 2019 г.

### ОТЗЫВ

ведущей организации – Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации на диссертацию Стрельцовой Марии Алексеевны по теме «Получение долгоживущих популяций НК-клеток человека, обладающих заданными характеристиками», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

### Актуальность темы исследования

Естественные, или натуральные, киллеры (НК-клетки) используют широкий спектр активирующих и ингибирующих рецепторов для детекции изменений в собственных клетках организма, которые могут произойти в процессах инфицирования, опухолевой трансформации или других нарушений. На протяжении своего развития и созревания НК-клетки меняют репертуар поверхностных белков и внутриклеточных сигнальных молекул, образуя субпопуляции клеток, различающихся функциональностью и реакцией на стимулы. Изменение профиля экспрессии ряда маркеров в процессе активации вносит дополнительное разнообразие в клеточный пул естественных киллеров. Хотя основные маркеры НК-клеток, связанные с их

активацией и дифференцировкой, хорошо известны, точные данные о характере экспрессии этих маркеров в различных условиях стимуляции НК-клеток еще не получены.

Противоопухолевая и противовирусная активность, проявляемая НК-клетками, обеспечивает стабильный интерес к возможностям использования этих клеток в клинике. Применение НК-клеток в адоптивной иммунотерапии характеризуется сниженным риском развития болезни «трансплантат против хозяина», по сравнению с использованием Т-лимфоцитов. Об актуальности и перспективности использования натуральных киллеров для лечения больных с онкологическими заболеваниями свидетельствует растущее год от года количество начатых клинических испытаний различных способов иммунотерапии на основе НК-клеток. Как правило, для использования в клинике НК-клетки должны быть активированы и размножены *in vitro* в условиях, обеспечивающих устойчивую продукцию большого количества клеток с выраженной противоопухолевой активностью. Этим преодолеваются проблемы малой численности НК-клеток в периферической крови и невысокой цитотоксической активности нативных клеток. Однако, при стимуляции НК-клеток разных индивидов наблюдается большая вариабельность в скорости роста и общем количестве клеток в культурах. Понимание закономерностей роста культур НК-клеток, в том числе, зависимости экспансии от состава исходного клеточного пула, предоставит возможность стандартизовать получение клеточных продуктов для последующего использования в клинике. Как пролиферативный, так и цитотоксический потенциал НК-клеток может быть дополнительно увеличен путем генетической модификации. Этот подход осложняется трудностью доставки генов в клетки этого типа, а также проблемой получения клинически значимого количества жизнеспособных и биологически активных НК-клеток. Дальнейшая разработка эффективных методов генетической инженерии может позволить не только нарабатывать большое количество модифицированных НК-клеток, но и позволит лучше понять физиологические аспекты их функционирования, включая устойчивость к заражению вирусами.

Таким образом, актуальность диссертационного исследования Стрельцовой Марии Алексеевны, которое ставит целью изучение и поиск

способов получения долгоживущих популяций НК-клеток человека, в том числе с помощью генетической модификации, не вызывает сомнений.

### **Научная новизна исследования, полученных результатов и выводов**

В работе Стрельцовой М.А. разработка подходов к получению цитотоксически активных популяций НК-клеток человека, обладающих повышенной продолжительностью жизни и экспансией проведена по двум направлениям. Первое направление включало выявление в общей популяции НК-клеток субпопуляций, обладающих повышенной пролиферативной активностью. Был разработан эффективный метод клонирования, позволяющий изучать гетерогенные клеточные популяции путем подробного анализа потомства единичных клеток, где в качестве начальной стимуляции использовалась комбинация ИЛ-2 и предварительно облученных генетически модифицированных клеток K562, экспрессирующих мембраносвязанный ИЛ-21. Такой способ клонирования НК-клеток ранее не применялся. Описаны две модели культивирования клонов, различающиеся по частоте рестимуляции клонов фидерными клетками, при использовании которых можно получить НК-клетки с разным фенотипом, функциональной активностью и продолжительностью жизни в культуре. В зависимости от целей работы, выбор может быть сделан в пользу той или иной модели культивирования. В диссертационной работе на клональном уровне проведено изучение изменения некоторых фенотипических характеристик НК-клеток. В частности, установлено, что экспрессия рецептора NKG2A может возникать *de novo* в потомстве изначально NKG2A-отрицательных НК-клеток, а маркер CD57 при культивировании может элиминироваться с клеточной поверхности. Полученные данные согласуются с современными представлениями, углубляют их и вносят вклад в развитие понимания фундаментальных аспектов физиологии натуральных киллеров, таких как фенотипическая стабильность.

Второе направление работы включало генетическую модификацию НК-клеток путем внедрения гена каталитической субъединицы теломеразы, которое должно было позволить увеличить пролиферативный потенциал клеток за счет преодоления лимита Хейфлика. Такая модификация

популяций и клонов нативных НК-клеток человека была успешно проведена с помощью ретровирусных векторов. Показано, что модифицированные геном hTERT клетки обладают повышенной активностью теломеразы. Автором выяснено, что эффективность ретровирусной генетической модификации зависит от степени дифференцировки НК-клеток и сделано предположение, которое было подтверждено серией экспериментов, что это связано с различной пролиферативной активностью этих клеток.

### **Достоверность полученных результатов и выводов**

Методическая часть работы выполнена на высоком уровне с применением большого набора современных экспериментальных методов. Экспериментальные данные описаны четко и ясно, материал логично выстроен. Результаты исследований обработаны корректно с использованием адекватных статистических методов. Выводы, сделанные в исследовании, согласуются с задачами и непосредственно следуют из полученных результатов. Основные результаты диссертации опубликованы в ряде известных международных и российских журналов, в том числе, PLoS One, International Journal of Molecular Sciences, Journal of Immunological Methods, Current Protocol in Cytometry, Биоорганическая химия, представлены на российских и международных конференциях.

Работа не содержит существенных недостатков. Однако, следует отметить наличие в работе некоторого количества опечаток и небрежно сформулированных предложений. Для анализа клонов НК-клеток, помимо метода проточной цитометрии, автору следовало бы более интенсивно использовать микроскопию, позволяющую выявить морфологические особенности клеток и характер клеточного роста в клонах с различной продолжительностью жизни, полученных из разных субпопуляций. Сделанные замечания имеют ознакомительный либо рекомендательный характер и не снижают научной ценности и общей высокой оценки представленной работы.

### **Значимость полученных результатов для науки и практики**

Разработанный Стрельцовой М.А. метод генерации клонов НК-клеток можно рассматривать как способ получения более однородных популяций НК-клеток, что имеет как теоретическую, так и практическую значимость.

Теоретическая значимость обоснована тем, что с помощью разработанного метода были получены данные о величине и гетерогенности пролиферативного потенциала НК-клеток, находящихся на разных стадиях созревания, в модели их стимуляции *in vitro*. Кроме того, на клеточном уровне более полно охарактеризованы фенотипические и функциональные изменения НК-клеток в процессах активации и дифференцировки. Данный метод клонирования НК-клеток можно использовать как для дальнейших исследований стабильности фенотипических характеристик НК-клеток, так и для накопления клональных культур НК-клеток с различными характеристиками.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что были получены знания о влиянии фенотипических особенностей НК-клеток на их выживаемость, экспансию и функциональный потенциал, что может быть использовано при наращивании НК-клеток для персонализированного клинического применения. Кроме того, практическая значимость работы заключена в разработке эффективного способа ретровирусной трансдукции НК-клеток и получении генномодифицированных НК-клеток, высокоэкспрессирующих ген каталитической субъединицы теломеразы.

Оптимизированный метод ретровирусной генной трансдукции НК-клеток можно использовать в дальнейшем для внедрения других генов в геном НК-клеток. Поскольку генетическая модификация в разработанных условиях не приводила к значительным изменениям фенотипа и функциональной активности НК-клеток, имеется возможность в дальнейшем использовать данный метод для фундаментальных исследований сигнальных путей и процессов дифференцировки НК-клеток.

### **Рекомендации по использованию результатов и выводов**

Считаем, что результаты данной работы могут быть использованы для фундаментальных исследований процессов развития и дифференцировки НК-клеток. Методика получения клональных культур НК-клеток может быть включена в программу обучения студентов иммунологическим методам.

Рекомендуется провести дальнейшие исследования гетерогенности популяций НК-клеток по ответу на стимуляцию *in vitro*, что может привести к уточнению и улучшению методов получения клеточных продуктов для последующего использования в клинике.

#### **Заключение.**

По актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости, достоверности полученных результатов и обоснованности выводов диссертационная работа Стрельцовой Марии Алексеевны по теме «Получение долгоживущих популяций НК-клеток человека, обладающих заданными характеристиками», представленная на соискание учёной степени кандидата биологических наук, является самостоятельным законченным научно-квалификационным исследованием, результаты которого имеют существенное значение для современной иммунологии.

В исследовании Стрельцовой Марии Алексеевны изучена важная научная задача – на основе выбора исходных характеристик НК-клеток, а также с помощью генетической модификации, разработаны способы получения долгоживущих популяций НК-клеток человека.

Таким образом, диссертационная работа Стрельцовой Марии Алексеевны соответствует критериям, установленным "Положением о присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; от 29.05.2017 г. № 650), а сам диссертант несомненно заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – Молекулярная биология.

Отзыв на диссертацию обсужден и одобрен на заседании кафедры иммунологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени

Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации  
(протокол № 7 от «29» августа 2019г.).

Старший научный сотрудник кафедры иммунологии  
ФГБОУ ВО РНИМУ Н.И. Пирогова Минздрава России,  
доктор медицинских наук, профессор                      Стенина Марина Александровна

  
«15» сентября 2019г.

Подпись профессора Стениной М.А. «удостоверяю»

Ученый секретарь  
ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова  
Минздрава России  
Д.м.н., доцент



Милушкина Ольга Юрьевна

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования «Российский национальный исследовательский  
медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства  
здравоохранения Российской Федерации  
117997, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1  
Тел.: (495) 434-14-22                      e-mail: [rsmu@rsmu.ru](mailto:rsmu@rsmu.ru)