

ОТЗЫВ

официального оппонента 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 выполненной работы

Иммунология внесла значительный вклад во многие разделы фундаментальной биологии и медицины. Наряду с теоретическими исследованиями в последнее время иммунология все более активно выступает в роли разработчика различных приложений, которые с успехом применяются при лечении онкологических, аутоиммунных, инфекционных и некоторых других заболеваний. Это направление исследований выделено в самостоятельный раздел, который получил название иммунотерапии. С иммунотерапевтическими целями используются различные компоненты иммунной системы. Среди иммунотерапевтических средств в первую очередь следует упомянуть антитела, далее идут Т-лимфоциты, дендритные клетки и некоторые другие. Вполне ожидаемо, что в этом ряду находятся также и НК-клетки, которые в иммунологических реакциях выполняют важные надзорные и эффекторные функции. Для иммунотерапевтического использования НК-клеток необходимо хорошо представлять биологию этого типа клеток, а также обладать технологией для *ex vivo* наращивания их биомассы, которая позволит сохранять функциональную активность клеток. При работе с НК-лимфоцитами приходится учитывать, что они представляют собой довольно гетерогенную популяцию клеток, которые имеют довольно ограниченное время жизни. Таким образом настоящая работа, нацеленная на создание долгоживущих НК-клеток, которые в будущем смогут использоваться при иммунотерапии опухолей является актуальным научным исследованием, которое имеет как фундаментальное, так и практическое значение.

Структура и объем диссертации

Работа построена по традиционному плану, состоит из введения, обзора литературы, включающего ссылки на работы преимущественно последних лет (278 источника, в том числе одна публикация в отечественном журнале и 277 в зарубежных изданиях), описания материалов и методов исследований, главы собственных исследований, обсуждения и выводов. Текст диссертации изложен на 149 страницах машинописного текста, работа иллюстрирована 35 рисунками и двумя таблицами.

Во **«Введении»** автор определяет актуальность темы исследования и степень ее разработанности, формулирует цель и задачи работы, описывает научную новизну

исследования, теоретическую и практическую значимость работы. Этот раздел содержит также информацию об апробации работы и публикациях, выполненных по теме диссертации.

Глава «**Обзор литературы**» демонстрирует хорошее знание материала, опубликованного по тематике диссертации, что помогает читателю ориентироваться в проблеме. Обзор начинается с рассмотрения биологии NK-клеток. Подробно рассматриваются этапы развития и формирование субпопуляций NK-клеток. Далее автор переходит к описанию рецепторов NK-клеток и функциональной характеристики NK-лимфоцитов. Особый интерес представляет обзор данных по развитию «адаптивных» NK-клеток. Само существование этого типа клеток до сих пор является спорным вопросом. В завершении литературного обзора диссертант останавливается на методах культивирования и возможной модификации NK-клеток. Этот раздел имеет непосредственное отношение к теме диссертации, он позволяет точнее представить степень изученности исследуемого вопроса и наметить перспективные методы по инженерии NK-клеток.

Используемые в диссертационном исследовании иммунологические, молекулярно-биологические и другие методы изложены в главе 2 «**Материалы и методы**». Исследования проводились на моноклеарных клетках, выделенных из венозной крови человека. NK-клетки обогащали с помощью отрицательной магнитной сепарации, что обеспечивало чистоту популяции не менее 97%. В работе широко применялся метод проточной цитометрии как в аналитическом, так и препаративном варианте. Диссертант использовал представительные панели моноклональных антител, которые позволяли детально фенотипировать субпопуляции NK-лимфоцитов с помощью многоцветной иммунофлуоресценции. Для того чтобы обеспечить пролиферацию NK-клеток в системе *in vitro* применялась стимуляция с помощью различных интерлейкинов. Отличительной особенностью методики стимуляции NK-клеток являлось использование фидерных клеток K562, несущих на своей поверхности мембрано-связанный IL-21. Анализ функциональной активности NK-клеток производился по измерению уровня активации каспазы 6 в клетках мишенях при инкубации с NK-клетками, а также по определению экспрессии LAMP-1 на поверхности NK-клеток. Эти методы дополнялись также измерениями уровня продукции IFN- γ в иммуноферментном анализе, внутриклеточного содержания гранзима В. Измерение уровня пролиферации NK-клеток определяли с помощью красителей CFSE и Hoechst 33342. Модификация NK-лимфоцитов осуществлялась с помощью ретровирусной трансдукции клеток.

Глава 3 «**Результаты**» посвящена описанию полученных данных. Прежде всего автором были определены условия стимуляции, которые обеспечивают увеличение продолжительности жизни НК-клеток. Для того чтобы сравнить различные варианты стимуляции Стрельцова М.А. определила фенотипы и функциональную активность клонов, полученных с помощью различных методов. Наилучшие результаты были получены при еженедельной рестимуляции клеток с применением комбинации IL-2 + K562-mbIL21. В этом случае клоны демонстрировали наибольшее увеличение уровня экспрессии CD16 и HLA-DR, молекул, которые характерны для активированных НК-клеток, способных к антитело-зависимой цитотоксичности. Важным достижением работы Стрельцовой М.А. является то, что многие измерения были выполнены не на тотальной популяции НК-клеток, а на отдельных клонах. Это дает более точное описание процессов происходящих при активации НК-лимфоцитов и создает более полную картину, которая учитывает гетерогенный характер популяции НК-клеток. Для экспансии НК-клонов были использованы как общие НК-клетки, так и отдельные субпопуляции, отличающиеся по степени дифференцировки. Среди циркулирующих НК-лимфоцитов можно выделить три субпопуляции: CD56brightCD57-, CD56dimCD57- и CD56dimCD57+. Среди них первая субпопуляция представляет наименее зрелые НК-клетки, а CD56dimCD57+ НК-клетки являются наиболее дифференцированными. Автором было обнаружено, что наименьшую склонность к образованию клонов проявляли высокодифференцированные CD56dimCD57bright клетки.

На следующем этапе работы полученные клоны НК-клеток были подробно изучены. Были определены их фенотипы, а также функциональная активность. Был проведен анализ стабильности экспрессии маркеров на поверхности клонов, в соответствии с изначальным фенотипом НК-клеток, из которых были получены данные клоны. Наконец, путем ретровирусной трансдукции было проведено внедрение дополнительного гена каталитической субъединицы комплекса теломеразы (hTERT) в НК-клетки с целью усилить их пролиферативный потенциал. Функционирование этого гена в НК-клетке подтверждалось существенным повышением интенсивности работы теломеразы в трансдуцированных НК-клетках и увеличением продолжительности жизни культур генномодифицированных НК-клеток *in vitro*. Таким образом, экспериментальная часть работы выглядит очень стройной и убедительной. В своей работе Стрельцова М.А. продемонстрировала возможность получения долгоживущих популяций НК-клеток человека, которые обладают заданными характеристиками.

В глава 4 «Обсуждение» проведено суммирование полученных результатов, а также их сравнение с литературными данными. В этом разделе намечены перспективы дальнейшей работы.

Выводы конкретны и полностью соответствуют цели и задачам выполненного исследования.

Научная новизна и научно-практическая значимость полученных результатов

Научная новизна исследования заключается в том, что автором разработан новый способ получения клонов НК-клеток человека. В этом методе НК-клетки человека, выделяют из периферической крови и подвергают стимуляции с помощью IL-2 в присутствии фидерных клеток, экспрессирующих мембраносвязанный IL-21.

Автором впервые было показано, что продолжительность жизни и выживаемость НК-клонов, их фенотипические и функциональные характеристики зависят от частоты рестимуляции клонов фидерными клетками.

Автором впервые установлено, что экспрессия рецептора NKG2A может возникать de novo в потомстве изначально NKG2A-негативных НК-клеток, а маркер CD57 может полностью исчезать с клеточной поверхности при культивировании в условиях стимуляции IL-2/K562-mbIL21.

Несомненная новизна исследования связана с геной инженерией НК-клеток путем ретровирусной трансдукции лимфоцитов. Автором показано, что введение гена hTERT приводило к повышению активности теломеразы и обеспечивало увеличение продолжительности жизни культур, модифицированных геном hTERT. Полученные результаты открывают новые возможности для получения НК-клеток с заданными свойствами, создают основы будущей технологии препаративной наработки НК-лимфоцитов и их использования в иммунотерапевтических целях.

Достоверность и обоснованность результатов исследования

В диссертации для решения поставленных задач были использованы самые современные методы исследования, среди которых можно отметить различные приложения проточной цитометрии, конфокальная микроскопия, методы молекулярной биологии и функциональные тесты на пролиферацию и цитотоксическую активность НК-клеток. Бесспорным достоинством диссертации является то, что в качестве главного объекта исследования выступали первичные лимфоциты человека и культуры клеток, которые были получены из них непосредственно. Все это указывает на высокий методический уровень диссертационной работы. Достаточный объем наблюдений, а также использование адекватной статистической обработки данных дает основания считать, что

полученные результаты являются достоверными, а выводы, сделанные на их основе вполне обоснованными.

По диссертации имеются некоторые замечания.

1. Я считаю, что следовало более подробно объяснить формулу для оценки общих частот образования клонов из субпопуляций клеток.
2. Автор констатирует, что выживаемость НК-клеток при стимуляции с помощью IL-2 на 4 день составляла не менее 60%. Непонятно, почему добавление K562-mbIL21 в эту систему приводило к существенному снижению выживаемости клеток (Рис. 4).
3. Вызывает возражение использование некоторых терминов. Например, «Рецептор антитело-зависимой клеточной цитотоксичности CD16» (стр. 72). Считаю, что следует писать «уровень поверхностной экспрессии CD16», но не «поверхностный уровень экспрессии CD16» (стр. 72). «Серопозитивность к IgG ЦМВ» (стр. 77).

Высказанные замечания не затрагивают полученных результатов и сущности сделанных выводов, а также не влияют на общую положительную оценку рассматриваемой диссертации.

Заключение

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.

Официальный оппонент

Филатов Александр Васильевич, *Филатов*

доктор биологических наук, профессор,

заведующий лабораторией иммунохимии

Федерального государственного бюджетного учреждения

«Государственный научный центр «Институт иммунологии»

Федерального медико-биологического агентства

115522, Москва, Каширское ш., 24

E-mail: avfilat@yandex.ru

