

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу

Стрельцовой Марии Алексеевны «Получение долгоживущих популяций НК-клеток человека, обладающих заданными характеристиками», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности

03.01.03 – молекулярная биология.

НК-клетки, или натуральные (естественные) киллеры, образуют малочисленную, но очень важную популяцию клеток иммунной системы. Эти большие гранулярные лимфоциты, в отличие от основной массы лимфоидных клеток, являются эффекторами эволюционно более раннего, по сравнению с адаптивным иммунитетом, механизма защиты организма, составляющего систему врожденного иммунитета. В настоящее время с НК клетками связывается реализация одной из основных функций системы иммунологического надзора. А именно, удаление из организма клеток с отсутствием «признаков своего» или клеток с присутствием признаков «изменённого своего». В частности, инфицированных вирусами клеток, либо накапливающих опасный уровень спонтанных мутаций, в том числе при злокачественных опухолях. Принципиальное различие между цитотоксическими Т-лимфоцитами и НК-клетками заключается в способности последних распознавать и элиминировать клетки-мишени без предварительной презентации антигена и пролиферации специфического клона. В основе распознавания натуральными киллерами клеток, подлежащих элиминации, лежит баланс позитивных и негативных сигналов, поступающих в НК-клетку при взаимодействии активирующих и ингибирующих рецепторов с соответствующими лигандами на поверхности клеток-мишеней.

Несмотря на то, что у натуральных киллеров нет рецепторов, формирующих в процессах рекомбинации спектр молекул с уникальной специфичностью, как у Т- или В-клеток, популяция НК-клеток является весьма гетерогенной: широкий и переменный репертуар экспрессируемых поверхностных молекул определяет огромное разнообразие фенотипа НК-лимфоцитов. Для изучения и анализа взаимосвязи между набором рецепторов НК-клеток, и свойствами этих клеток, был разработан ряд методов получения клонов натуральных киллеров; с их помощью были получены важные данные о свойствах тех или иных субпопуляций НК-клеток. Однако

имеющиеся на данный момент методы весьма трудоемки, и имеют ограничения, касающиеся, в том числе, максимального количества клеток клона (величины экспансии).

Одной из задач данной диссертационной работы стала разработка нового, более удобного и эффективного, метода получения и культивирования клонов НК-клеток, а также увеличения длительности жизни и экспансии полученных клонов. Поставленные задачи были решены с помощью оригинальных подходов. Первый из них состоял в применении особых фидерных клеток, разработанных независимой группой коллег для увеличения экспансии отдельных субпопуляций НК-клеток. Эти фидерные клетки представляют собой генно-модифицированную линию K562, экспрессирующую мембраносвязанный IL-21. Второй подход заключался во введении в клетки получаемых клонов гена каталитической субъединицы теломеразы человека, с тем, чтобы искусственно вызвать удлинение теломер, что должно способствовать увеличению возможного числа делений клетки, в норме ограниченного лимитом Хейфлика.

В ходе выполнения данной работы Марией Алексеевной Стрельцовой был получен ряд важных результатов:

1. Разработаны две модели культивирования клонов НК-клеток, первая из которых отличается относительно невысокой (5 недель) продолжительностью жизни клонов и, одновременно, приводит к генерации клонов с фенотипом активированных НК-клеток. Вторая модель характеризуется заметно более высокой продолжительностью жизни (до 14 недель) и экспансией (до 10 млн. клеток на клон), но менее активированным фенотипом. Таким образом, Мария Алексеевна продемонстрировала возможность проведения исследований с учётом анализа влияния на размер популяции и свойства генерируемых клонов путем модуляции условий культивирования.

2. Исследованы свойства клонов, полученных из ряда субпопуляций НК-клеток, различающихся по стадии дифференцировки и исходному уровню активации. Было обнаружено, что, как уровень активации, оцененный по поверхностной экспрессии молекулы HLA-DR, так и экспрессия рецептора NKG2C, слабо влияют на эффективность клонирования, в то время как стадия дифференцировки исходных НК-клеток во многом определяет эту эффективность. Наименее дифференцированные НК-клетки периферической крови, относящиеся к субпопуляции CD56<sup>bright</sup>,

демонстрировали наивысшую эффективность клонирования, а терминально дифференцированные клетки CD57<sup>bright</sup> – напротив, самую низкую. Таким образом, была выявлена взаимосвязь между свойствами исходных НК-клеток и получаемыми клонами. Наибольшее количество клеток в клоне и самая высокая выживаемость клона были зафиксированы для НК-клеток субпопуляции CD56<sup>dim</sup>CD57<sup>-</sup>HLA-DR<sup>-</sup>.

3. Интересным результатом работы стало обнаружение факта исчезновения антигена CD57 на клетках некоторых клонов. CD57 считается маркером терминальной дифференцировки, и, по имеющимся ранее данным, однажды появившись, сохранялся на поверхности НК-клеток до конца их жизни. Данные М.А. Стрельцовой указывают на возможность прекращения экспрессии CD57, что является интересным аргументом в пользу дальнейшего исследования механизмов дедифференцировки НК-клеток, а также тарандифференцировки, с учетом обнаружения *de novo* экспрессии рецептора NKG2A, маркера ранней стадии дифференцировки НК-клеток, на клонах, полученных из NKG2A-негативных клеток.

4. Наконец, особо следует отметить эксперименты Марии Алексеевны, посвящённые попыткам иммортализации клонов НК-клеток с помощью введения в клетки гена hTERT с помощью ретровирусных векторов. Марии Алексеевне удалось провести успешную трансдукцию клонов, обладающих высоким пролиферативным потенциалом. Было достоверно показано, что трансдуцированные клетки обладали большей продолжительностью жизни по сравнению с нетрансдуцированными. К сожалению, в данной модели не удалось показать неограниченную пролиферацию (иммортализацию) НК-клеток, однако, полагаю, что эту задачу можно решить в дальнейшем путем подбора специальных условий культивирования НК-клеток.

Цель диссертационной работы и сформулированные задачи исследования, включающие разработку метода культивирования клонов НК-клеток, обладающих требуемыми свойствами, привели к получению результатов, существенных как для экспериментальной, так и для возможных будущих научно-клинических исследований в иммунологии. Благодаря проделанной работе реализован удобный и эффективный способ получения клонов НК-клеток, что облегчит проведение исследований, направленных на изучение свойств отдельных микропопуляций НК-клеток. Помимо этого, данный подход открывает новые перспективы для разработки методов использования НК-клеток в противоопухолевой иммунотерапии, так как позволяет наращивать определенные типы НК-клеток, свойства которых можно подобрать,

исходя из требований конкретных патологических состояний. Разработанные Марией Алексеевной модели стимуляции позволят искусственно регулировать уровни цитокин-продуцирующей и цитотоксической активности культивируемых НК-клеток. Следует отметить, что в основу полученных результатов легло применение инновационного метода экспансии НК-клеток, что обеспечило новизну и современный уровень диссертационной работы.

Диссертация написана по общепринятому плану. Введение, литературный обзор, материалы и методы, результаты и их обсуждение автор разместил в 5 главах. Диссертация изложена на 149 страницах машинописного текста, включает 35 рисунков и 2 таблицы. Список литературы содержит 278 источников.

Обзор литературы охватывает самые современные представления и обобщает многообразные сведения о субпопуляциях, механизмах функционирования и активации натуральных киллеров. Отдельные разделы обзора посвящены условиям культивирования и генетической модификации НК-клеток, автор также уделила особое внимание информации о противоопухолевой активности НК-клеток, что весьма существенно, учитывая потенциальную клиническую значимость работы. Обзор написан ясно, логично, в хорошем стиле.

Работа выполнена на высоком научном и методическом уровне с использованием широкого арсенала современных технологических подходов. Получен большой объем экспериментальных данных, результаты исследования хорошо описаны и не вызывают сомнений в их достоверности. Статистическая обработка полученных данных выполнена корректно. Обсуждение результатов вынесено в отдельную главу и содержит 13 страниц. В этой главе обоснован выбор методов, которые были использованы для решения поставленных задач и проведено сравнение результатов экспериментов с литературными данными и сделан ряд интересных предположений о механизмах формирования иммунного ответа НК-клеток. Выводы диссертации научно обоснованы, четко сформулированы, соответствуют поставленным задачам и полученным результатам.

Материалы диссертации были представлены на международных и российских научных форумах. Основные результаты диссертационной работы опубликованы в 9 статьях в рецензируемых научных журналах.

В работе Стрельцовой М.А. не удалось обнаружить существенных недостатков.

Таким образом, диссертационная работа М.А. Стрельцовой, выполненная под руководством кандидата биологических наук Е.И. Коваленко, является законченной научно-квалификационной работой, содержащей новое решение актуальной проблемы – разработки методов получения клонов НК-клеток и искусственного модулирования свойств полученных клонов, что имеет существенное значение как для фундаментальной, так и для прикладной иммунологии.

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

**Ларин Сергей Сергеевич,**

кандидат биологических наук,

заместитель директора по научной работе

Высшей школы молекулярной и экспериментальной медицины

Федерального государственного бюджетного учреждения

«Национальный медицинский исследовательский центр

детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева»

117198, Москва, ул. Саморы Машела, 1

Тел. +7 495 287 65 70.

E-mail: sergei\_larin@mail.ru

Подпись Ларина С.С. заверяю, учёный секретарь Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Проф., д.м.н.



Спиридонова Е.А.