

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ
Кафедра генетики

АКУНЕЦ
Анна Руслановна

**ПОЛУЧЕНИЕ В УСЛОВИЯХ *IN VITRO* БИОМАССЫ И КОНТРОЛЬ
КАЧЕСТВА ЕСТЕСТВЕННЫХ КИЛЛЕРНЫХ КЛЕТОК КАК ОСНОВЫ
БИОМЕДИЦИНСКИХ КЛЕТОЧНЫХ ПРОДУКТОВ**

Аннотация к дипломной работе

Научный руководитель:
кандидат биологических наук,
зав. лаборатории иммунологии и
вирусологии Института биофизики и
клеточной инженерии НАН Беларуси
Е.В. Дуж

Минск, 2025

РЕФЕРАТ

Дипломная работа содержит 84 страницы, 9 рисунков, 17 таблиц, 2 формулы, 89 использованных источников.

Ключевые слова: ЕСТЕСТВЕННЫЕ КИЛЛЕРНЫЕ КЛЕТКИ, ЦИТОТОКСИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ, ЦИТОТОКСИЧЕСКИЕ БЕЛКИ, ИНГИБИРУЮЩИЕ РЕЦЕПТОРЫ, АЛЛОГЕННАЯ ТЕРАПИЯ, БИОМЕДИЦИНСКИЕ КЛЕТОЧНЫЕ ПРОДУКТЫ, КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА.

Объект исследования: в исследовании использовали периферическую кровь 10 здоровых доноров для получения ЕКК.

Цель работы: получить в условиях *in vitro* биомассу ЕКК и провести контроль ее качества.

Методы исследования: культуральные, проточная цитометрия, молекулярно-биологические, статистический анализ.

Полученные результаты:

1. После получения в условиях *in vitro* биомассы ЕКК она проходила многоступенчатый контроль качества, предполагающий контроль подлинности и контроль стерильности клеток.

2. Культивирование ЕКК, выделенных из периферической крови 10 здоровых доноров, в питательной среде с добавлением цитокинов (ИЛ-2 и ИЛ-15) позволило получить биомассу жизнеспособных функционально активных CD3⁺CD56⁺-клеток. Процент жизнеспособных клеток составил более 90%, а их содержание от CD45⁺-клеток – более 70%. Клетки характеризовались экспрессией внутриклеточных цитотоксических белков. Причем экспрессия перфорины и гранзима В находилась на более высоком уровне по сравнению с уровнем экспрессии гранулизина. О функциональной активности клеток свидетельствовала цитотоксическая активность ЕКК, сокультивированных с клеточной линией К-562 в соотношениях 5:1 и 10:1 соответственно.

3. Биомасса ЕКК прошла не только контроль подлинности, но и контроль стерильности, о чем свидетельствовало отсутствие вирусной контаминации: вирусом простого герпеса I и II; вирусами герпеса человека IV, V, VI типов; вирусом ветряной оспы.

4. При подборе пары донор-реципиент для аллогенной клеточной терапии необходимо знать спектр экспрессии ингибирующих рецепторов KIR на поверхности ЕКК доноров и HLA-фенотип реципиента. Для проявления ЕКК аллореактивности с минимальным риском развития РТПХ необходимо, чтобы у реципиента отсутствовал лиганд к одному из ингибирующих рецепторов KIR, экспрессируемых на поверхности ЕКК.

5. Полученная в условиях *in vitro* биомасса ЕКК, выделенных из периферической крови 10 здоровых доноров, прошла многоступенчатый контроль качества и может быть использована в дальнейшем для получения БМКП для аллогенной терапии.

РЭФЕРАТ

Дыпломная работа ўтрымлівае 84 старонкі, 9 малюнкаў, 17 табліц, 2 формулы, 89 выкарыстаных крыніц.

Ключавыя словы: НАТУРАЛЬНЫЯ КЛЕРНЫЯ КЛЕТКІ, ЦЫТАТАКСІЧНАЯ АКТЫЎНАСЦЬ, ЦЫТАТАКСІЧНЫЯ БЕЛКІ, ІНГІБІРУЮЧЫЯ РЭЦЭПТАРЫ, АЛАГЕННАЯ ТЭРАПІЯ, БІЯМЕДЫЦЫНСКІЯ КЛЕТАЧНЫЯ ПРАДУКТЫ, КАНТРОЛЬ ЯКАСЦІ.

Аб'ект даследавання: у даследаванні выкарыстоўвалі перыферычную кроў 10 здаровых донараў для атрымання НКК.

Мэта працы: атрымаць ва ўмовах *in vitro* біямасу НКК і правесці кантроль яе якасці.

Метады даследавання: культуральныя, праточная цытаметрыя, малекулярна-біялагічныя, статыстычны аналіз.

Атрыманыя вынікі:

1. Пасля атрымання ва ўмовах *in vitro* біямасы НКК яна праходзіла шматступенны кантроль якасці, які прадугледжвае кантроль сапраўднасці і кантроль стэрыльнасці клетак.

2. Культываванне НКК, выдзеленых з перыферычнай крыві 10 здаровых донараў, у пажыўным асяроддзі з даданнем цытакінаў (ІЛ-2 і ІЛ-15) дазволіла атрымаць біямасу жыццяздольных функцыянальна актыўных CD3⁺CD56⁺-клетак. Працэнт жыццяздольных клетак склаў больш за 90%, а іх змест ад CD45⁺-клетак – больш за 70%. Клеткі характарызаваліся экспрэсіяй унутрыклеткавых цытатаксічных бялкоў. Прычым экспрэсія перфарыну і гранзіму В знаходзілася на больш высокім узроўні ў параўнанні з узроўнем экспрэсіі гранулізіну. Аб функцыянальнай актыўнасці клетак сведчыла цытатаксічная актыўнасць НКК, сакультываваных з клеткавай лініяй K-562 у суадносінах 5:1 і 10:1 адпаведна.

3. Біямаса НКК прайшла не толькі кантроль сапраўднасці, але і кантроль стэрыльнасці, аб чым сведчыла адсутнасць віруснай кантамінацыі: вірусам простага герпесу I і II; вірусамі герпесу чалавека IV, V, VI тыпаў; вірусам ветраной воспы.

4. Пры падборы пары донар-рэцыпіент для алагеннай клеткавай тэрапіі неабходна ведаць спектр экспрэсіі інгібіруючых рэцэптараў KIR на паверхні НКК донараў і HLA-фенатып рэцыпіента. Для праявы НКК аларэактыўнасці з мінімальнай рызыкай развіцця РТСГ неабходна, каб у рэцыпіента адсутнічаў ліганд да аднаго з інгібіруючых рэцэптараў KIR, экспрэсаваных на паверхні НКК.

5. Атрыманая ва ўмовах *in vitro* біямаса НКК, выдзеленых з перыферычнай крыві 10 здаровых донараў, прайшла шматступенны кантроль якасці і можа быць выкарыстана ў далейшым для атрымання БМКП для алагеннай тэрапіі.

ABSTRACT

The diploma work contains 84 pages, 9 figures, 17 tables, 2 formulas, 89 references.

Key words: NATURAL KILLER CELLS, CYTOTOXIC ACTIVITY, CYTOTOXIC PROTEINS, INHIBITORY RECEPTORS, ALLOGENEIC THERAPY, BIOMEDICAL CELL PRODUCTS, QUALITY CONTROL.

The object of the study: the peripheral blood of 10 healthy donors was used in the study to obtain NK-cells.

The purpose of the work: to obtain NK-cell biomass *in vitro* and to control its quality.

Research methods: cultural, flow cytometry, molecular-biological, statistical analysis.

Results obtained:

1. After obtaining the NK-cell biomass *in vitro*, it underwent multistage quality control, including cell authenticity control and sterility control.
2. Cultivation of NK-cells isolated from the peripheral blood of 10 healthy donors in a nutrient medium with the addition of cytokines (IL-2 and IL-15) allowed us to obtain a biomass of viable functionally active CD3⁺CD56⁺-cells. The percentage of viable cells was more than 90%, and their content from CD45⁺-cells was more than 70%. The cells were characterized by the expression of intracellular cytotoxic proteins. Moreover, the expression of perforin and granzyme B was at a higher level compared to the level of granulysin expression. The functional activity of the cells was evidenced by the cytotoxic activity of NK-cells co-cultured with the K-562 cell line in ratios of 5:1 and 10:1 respectively.
3. The NK cell biomass underwent not only authenticity control, but also sterility control, as evidenced by the absence of viral contamination: *Herpes simplex virus I and II*; *Human herpesviruses types IV, V, VI*; *Varicella Zoster virus*.
4. When selecting a donor-recipient pair for allogeneic cell therapy, it is necessary to know the expression spectrum of inhibitory KIR-receptors on the surface of donor NK-cells and the recipient's HLA-phenotype. For NK cell-alloreactivity to manifest with a minimal risk of developing GvHD, the recipient must lack a ligand to one of the inhibitory KIR-receptors expressed on the NK-cell surface.
5. The NK-cell biomass obtained *in vitro*, isolated from the peripheral blood of 10 healthy donors, underwent multistage quality control and can be used in the future to obtain BMCP for allogeneic therapy.