

«УТВЕРЖДАЮ»

Проректор по научной работе
Федерального государственного автономного
образовательного учреждения высшего
образования «Российский национальный
исследовательский медицинский университет
им. Н.И. Пирогова» Министерства
здравоохранения Российской Федерации
д.б.н. профессор РАН Д.В. Ребриков



«17» сентября

2021 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации – Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации на диссертацию Куст Софьи Алексеевны по теме «Получение, анализ свойств и иммунологической роли субпопуляции NK-клеток, экспрессирующих HLA-DR», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

Актуальность темы исследования

Диссертационная работа С.А. Куст посвящена изучению механизмов появления, фенотипических и функциональных особенностей HLA-DR-экспрессирующих NK-клеток человека и их иммунологического ответа на антигены микобактерий.

NK-клетки, или естественные киллеры, лимфоидные клетки системы врожденного иммунитета, играют важную роль в защите организма от вирусных, бактериальных и других патогенов, а также обладают

способностью распознавать и лизировать опухолевые клетки. Последнее свойство позволяет использовать НК-клетки в качестве агентов для адоптивной иммунотерапии, и изучение методов и механизмов их активации, наращивания *in vitro*, получения цитотоксически активного клеточного продукта является актуальной задачей.

Переход НК-клеток из состояния покоя в состояние активации может сопровождаться запуском пролиферации НК-клеток, увеличением их функционального ответа, повышением экспрессии активирующих рецепторов и других поверхностных маркеров, в том числе, молекулы HLA-DR – подтипа МНС класса II (МНС II). Функциональная значимость молекулы HLA-DR для жизнедеятельности НК-клеток до сих пор оставалась малоизученной. В частности, актуальным является вопрос о способности HLA-DR⁺ НК-клеток стимулировать антиген-специфичный Т-клеточный ответ, поскольку основной функцией молекулы МНС II в организме является антиген-презентация. Опубликовано несколько исследований, демонстрирующих способность HLA-DR-позитивных НК-клеток индуцировать Т-клеточный ответ на ограниченное число антигенов, поэтому изучение способности HLA-DR-позитивных НК-клеток презентировать антигены *M. tuberculosis* несомненно является актуальной. Повышение уровня HLA-DR-позитивных НК-клеток в тканях и периферической крови зарегистрировано при некоторых патологических состояниях, в том числе в легких при туберкулезной инфекции, при этом их функциональная роль в ответе на данную инфекцию мало изучена.

Таким образом, актуальность диссертационного исследования С.А. Куст посвященное изучению свойств HLA-DR-экспрессирующих НК-клеток человека и их иммунологического ответа на антигены микобактерий, для фундаментальной науки, а в перспективе и для практической медицины, не вызывает сомнений.

Научная новизна исследования, полученных результатов и выводов

В диссертационной работе С.А. Куст охарактеризовано два пула циркулирующих в периферической крови человека HLA-DR-позитивных NK-клеток, различающихся по функциональной активности: менее дифференцированные клетки HLA-DR⁺CD56^{bright}, и более зрелые клетки HLA-DR⁺CD56^{dim}CD57⁺, в том числе адаптивные – экспрессирующие NKG2C. Более того, впервые показано, что активация и увеличение экспрессии HLA-DR и NKG2C на NK-клетках происходит уже на стадии дифференцировки CD56^{dim}CD57⁻, и по ряду других характерных фенотипических и функциональных признаков можно предположить, что NK-клетки CD56^{dim}CD57⁻NKG2C⁺ являются предшественниками адаптивных клеток CD56^{dim}CD57⁺NKG2C⁺.

Разработана эффективная методика экспансии HLA-DR-позитивных NK-клеток *in vitro* с использованием IL-2 и фидерных клеток K562-mbIL21, позволяющая увеличить их количество до 80% и более. Показана ассоциация экспрессии HLA-DR на NK-клетках с продукцией ими IFN γ *ex vivo* и *in vitro* и с более интенсивной дегрануляцией по отношению к фидерным клеткам. Выявлено, что при экспансии NK-клеток *in vitro* экспрессия HLA-DR ассоциирована также с высокой пролиферативной активностью, а также с более высокой экспрессией рецепторов NKG2D, CD86.

Впервые показано, что *in vitro* экспрессия HLA-DR может запускаться не только экзогенным IL-21, но и продуцируемым самими NK-клетками эндогенным IFN γ , по STAT3- и ERK1/2-зависимому пути через активацию изоформы 3 транскрипционного фактора СІТА.

Помимо этого, в диссертационной работе показано, что в крови пациентов, больных туберкулезом, доля HLA-DR⁺ NK-клеток повышена по сравнению со здоровыми донорами. В ответ на стимуляцию разрушенными бактериями *M. tuberculosis* зарегистрирована экспансия NKG2A⁺CD57⁻KIR⁻ HLA-DR⁺ NK-клеток, интенсивнее продуцирующих IFN γ в ответ на

микобактериальные антигены, чем HLA-DR-негативные NK-клетки. Автором впервые продемонстрировано, что HLA-DR-позитивные NK-клетки способны запускать специфическую активацию CD4⁺ Т-клеток после предварительной инкубации с разрушенными микобактериями, однако с меньшей эффективностью, чем профессиональные антиген-презентирующие клетки.

Достоверность полученных результатов и выводов

Методическая часть работы С.А. Куст выполнена на высоком уровне с применением большого набора современных молекулярно-биологических 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. В целом, результаты исследования являются достоверными, а выводы – обоснованными. Основные результаты диссертации опубликованы в 8 статьях в международных и российских журналах, в том числе из перечня ВАК РФ, включая *Immunology and Cell Biology*, *International Journal of Molecular Sciences*, *Journal of Leukocyte Biology*, *Frontiers in Immunology*, Российский иммунологический журнал, и в 13 тезисах российских и международных конференций.

При ознакомлении с текстом диссертации возникло несколько замечаний, которые не носят принципиального характера. Так, при анализе экспрессии HLA-DR *in vivo* на NK-клетках различной степени дифференцировки (глава 3.1.) не совсем понятно, почему разделили здоровых индивидов на 2 группы по доле клеток HLA-DR⁺ в субпопуляции CD56^{dim}CD57⁺ более и менее 5%. В разделе 3.3. не точно объяснено, почему выбраны для анализа только 20 наиболее значимо дифференциально экспрессирующихся генов. Стоит отметить также несколько стилистических неточностей, не совсем корректное использование некоторых терминов и опечатки в некоторых рисунках.

Приведенные замечания не влияют на общую положительную оценку работы и не снижают ее научную и практическую значимость. Работа С.А. Куст является завершенным оригинальным научным трудом, заслуживающим высокой оценки.

Значимость полученных результатов для науки и практики

Полученные С.А. Куст результаты имеют фундаментальное и практическое значение и позволяют расширить наши знания о мало описанной в литературе субпопуляции НК-клеток, экспрессирующих на своей поверхности молекулу HLA-DR. Полученные данные о фенотипе, стадиях дифференцировки, функциональной, пролиферативной и метаболической активности HLA-DR-экспрессирующих НК-клеток человека дополняют имеющиеся представления об иммунологической роли НК-клеток.

Практическая значимость данной работы, во-первых, связана с тем, что HLA-DR-экспрессирующие НК-клетки сами по себе могут стать перспективным агентом для использования в адоптивной иммунотерапии за счет возможности комбинированного использования киллерной и антиген-презентирующей активности. В данной работе разработан эффективный метод экспансии субпопуляции НК-клеток HLA-DR⁺ с использованием IL-2 и фидерной клеточной линии K562-mbIL21.

Более того, терапевтическое использование НК-клеток требует предварительной стимуляции *in vitro* для их наращивания и повышения функциональной активности. Поскольку существующие на данный момент способы наращивания НК-клеток приводят к значительному увеличению доли HLA-DR-экспрессирующих клеток в культуре, полученные в работе С.А. Куст данные о различных изменениях, сопутствующих экспрессии HLA-DR в НК-клетках, могут помочь при разработке методов получения НК-клеточного терапевтического продукта.

Рекомендации по использованию результатов и выводов

Результаты и выводы, полученные С.А. Куст, могут быть использованы для фундаментальных исследований процессов развития, дифференцировки и активации NK-клеток, а также особенностей их функционального ответа на различные антигены. Методика экспансии субпопуляции NK-клеток HLA-DR⁺ с использованием IL-2 и фидерной клеточной линии K562-mbIL21 может быть использована для разработки терапевтического NK-клеточного продукта.

Заключение

По актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости, достоверности полученных результатов и обоснованности выводов диссертационная работа Куст Софьи Алексеевны по теме «Получение, анализ свойств и иммунологической роли субпопуляции NK-клеток, экспрессирующих HLA-DR», представленная на соискание учёной степени кандидата биологических наук, является самостоятельным законченным научно-квалификационным исследованием, результаты которого имеют существенное значение для современной иммунологии и молекулярной биологии.

В исследовании Куст Софьи Алексеевны изучены физиологические и функциональные особенности значимой субпопуляции NK-клеток человека – экспрессирующих молекулы HLA-DR, а также разработан эффективный способ наращивания этой субпопуляции *in vitro*.

Таким образом, диссертационная работа Куст Софьи 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; от 20.03.2021 г. №426), 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 НИЛ «Медицинская геномика» Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования "Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова" Министерства здравоохранения Российской Федерации (протокол № 1 от «15» сентября 2021г.).

Заведующий НИЛ «Медицинская геномика»
Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования "Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова" Министерства здравоохранения Российской Федерации

Кандидат биологических наук, доцент

« 16 » 09 2021г.

Кулакова Ольга Георгиевна

«Подпись Кулаковой О.Г. заверяю»

Ученый секретарь ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России
кандидат медицинских наук, доцент

Демина Ольга Михайловна



Федеральное государственное автономное 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.: +7 (495) 434-03-29

e-mail: rsmu@rsmu.ru