

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.037.01,**  
созданного на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки  
Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова  
Российской академии наук,  
по диссертации на соискание ученой степени кандидата наук

аттестационное дело № \_\_\_\_\_

решение диссертационного совета от 20 октября 2021 г. № 9

О присуждении **Куст Софье Алексеевне**, гражданке Российской Федерации, ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Получение, анализ свойств и иммунологической роли субпопуляции НК-клеток, экспрессирующих HLA-DR» по специальности 03.01.03 – молекулярная биология принята к защите 18 июня 2021 г. (протокол заседания № 5) диссертационным советом 24.1.037.01, созданным на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (117997, г. Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10), действующим на основании Приказа Минобрнауки России № 75/нк от 15.02.2013 г., а также Приказа Минобрнауки России № 561 от 03.06.2021 г.

Соискатель Куст Софья Алексеевна, 2 июня 1993 года рождения, в 2015 году окончила Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова» по специальности «Биохимия».

С 2015 по 2019 гг. обучалась в аспирантуре Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН). В настоящее время работает в должности младшего научного сотрудника в лаборатории клеточных взаимодействий ИБХ РАН. Диссертация выполнена в лаборатории клеточных взаимодействий ИБХ РАН.

Научный руководитель - кандидат биологических наук Коваленко Елена Ивановна, старший научный сотрудник лаборатории клеточных взаимодействий Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

**Официальные оппоненты:**

**Филатов Александр Васильевич**, доктор биологических наук, заведующий лабораторией иммунохимии Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства России;



**Лупатов Алексей Юрьевич**, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной биологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича»

дали положительные отзывы на диссертацию.

**Ведущая организация** Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Москва, в своем положительном отзыве, подписанном Кулаковой Ольгой Георгиевной, кандидатом биологических наук, доцентом, заведующей НИЛ «Медицинская геномика», и утвержденном Ребриковым Денисом Владимировичем, доктором биологических наук, профессором РАН, проректором по научной работе, указала, что диссертационная работа Куст Софьи Алексеевны по теме «Получение, анализ свойств и иммунологической роли субпопуляции NK-клеток, экспрессирующих HLA-DR» является самостоятельным законченным научно-квалификационным исследованием, результаты которого имеют существенное значение для современной иммунологии и молекулярной биологии, и 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.

Соискатель имеет опубликованных 14 работ, в том числе по теме диссертации 8 работ общим объемом 6 печатных листов, опубликованных в рецензируемых научных изданиях, входящих в базы данных Scopus и Web of Science. В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени работах. Научные работы по теме диссертации, в которые Куст С.А. внесла основной или существенный вклад:

1. Стрельцова М.А., **Ерохина С.А.**, Каневский Л.М., Коваленко Е.И. Сравнительный анализ поверхностных маркеров клонов NK-клеток человека. Российский иммунологический журнал, 2015, 9(18), 3(1): 218- 220.
2. Kovalenko; E.I., Streltsova, M.A., Kanevskiy, L.M., Erokhina, S.A., Telford, W.G. Identification of human memory-like NK cells. Curr. Protoc. Cytom., 2017, 79: 9.50.1-9.50.11. doi: 10.1002/cpsy.13
3. **Erokhina, S.A.**, Streltsova, M.A., Kanevskiy, L.M., Telford, W.G., Sapozhnikov, A.M. and Kovalenko, E.I. HLA-DR+ NK cells are mostly characterized by less mature phenotype and high functional activity. Immunol Cell Biol, 2018, 96(2): 212–228. doi:10.1111/imcb.1032
4. Streltsova M.A., **Erokhina S.A.**, Kanevskiy L.M., Grechikhina M.V., Kobyzeva P.A., Lee D.A., Telford W.G., Sapozhnikov A.M., Kovalenko E.I. Recurrent stimulation of NK cell clones with K562 expressing membrane-bound IL-21 affects their phenotype,



- IFN- $\gamma$  production and lifespan. *Int J Mol Sci.*, 2019, 20(2): E443. doi: 10.3390/ijms20020443.
5. Kanevskiy, L.M., **Erokhina, S.A.**, Streltsova, M.A., et al. The Role of O-Antigen in LPS-Induced Activation of Human NK Cells. *J Immunol Res.*, 2019, 2019: 3062754. doi: 10.1155/2019/3062754.
  6. **Erokhina, S.A.**, Streltsova, M.A., Kanevskiy, L.M., Grechikhina, M.V., Sapozhnikov, A.M., Kovalenko, E.I. HLA-DR-expressing NK cells: effective killers suspected for antigen presentation. *J Leukoc Biol.*, 2020, 109(2): 1-11. doi: 10.1002/JLB.3RU0420-668RR.
  7. Kobyzeva, P.A., Streltsova, M.A., **Erokhina, S.A.**, Kanevskiy L.M., Telford W.G., Sapozhnikov A.M., Kovalenko E.I. CD56<sup>dim</sup>CD57<sup>-</sup>NKG2C<sup>+</sup> NK cells retaining proliferative potential are possible precursors of CD57<sup>+</sup>NKG2C<sup>+</sup> memory-like NK cells. *J Leukoc Biol.*, 2020, 108(4): 1379–1395. doi: 10.1002/JLB.1MA0720-654RR.
  8. **Kust, S. A.**, Streltsova, M. A., Pantelev, A. V., Karpina, N. L., Lyadova, I. V., Sapozhnikov, A. M., Kovalenko, E. I. HLA-DR-Positive NK Cells Expand in Response to Mycobacterium Tuberculosis Antigens and Mediate Mycobacteria-Induced T Cell Activation. *Front. Immunol.*, 2021, 12: 662128. doi: 10.3389/fimmu.2021.662128.

На диссертацию поступили отзывы:

**Отзыв официального оппонента д.б.н. Филатова Александра Васильевича.** Отзыв положительный, содержит следующие замечания:

1. Диссертация изобилует описанием полного фенотипа исследованных субпопуляций NK-клеток. Например, «NK-клетки CD56brightHLA-DR<sup>+</sup> меньше отличались ... от клеток CD56brightHLA-DR<sup>-</sup>, чем клетки CD56dimCD57<sup>+</sup>NKG2C<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> от клеток CD56dimCD57<sup>+</sup>NKG2C<sup>-</sup>HLA-DR<sup>-</sup> (рис. 10)». Такие сложные обозначения сильно затрудняют чтение и понимание текста. Считаю, что длинные описания можно было заменить на более краткие и образные названия типа, «ранние NK-клетки», «поздние NK-клетки», «дубль-позитивные NK-клетки» или что-то другое в этом роде.
2. В главе 3.1 доноры были поделены на группы 1 и 2. Критерием разделения на группы был следующий параметр. «В группу 1 входят лица, у которых доля HLA-DR-позитивных NK-клеток в субпопуляции CD56dimCD57<sup>+</sup> составила менее 5%, в группе 2 – более 5%.» После такого разделения мне представляется избыточным определение насколько достоверны отличия указанных групп по проценту HLA-DR-позитивных клеток с подсчетом величины  $p$ .
3. Считаю необходимым в подписях к рисункам указывать количество доноров, принявших участие в этом конкретном эксперименте. Количество доноров можно косвенно оценивать по количеству точек на графике, но желательно это число указывать в явном виде.
4. При анализе главных компонент приведен график в координатах PC4 против PC3. Непонятно почему отсутствует график в самых главных компонентах з PC2 против PC1.
5. Наиболее интересные данные были получены методом РНК-секвенирования. В подписи к рисунку 9 указано, что анализ был проведен на клетках от двух доноров в



двух повторностях. При этом необходимо было указать какие это были повторности, технические реплики или полностью независимые эксперименты. В подписи к рисунку 10 совсем отсутствуют сведения о повторностях. Можно только догадываться, что они были теми же, что и на рисунке 9.

6. Мне представляется неудачным использование термина «интенсивность экспрессии HLA-DR» (стр. 91).

**Отзыв официального оппонента к.б.н. Лупатова Алексея Юрьевича.** Отзыв положительный, содержит следующие замечания:

1. Все полученные автором результаты представлены только в виде графиков и таблиц. Поскольку в ряде случаев (например, стр. 106) автор упоминает изменение морфологии НК-клеток при их дифференцировке, включая форму, размер, гранулярность, наличие хотя бы нескольких микрофотографий, иллюстрирующих эти изменения, определенно, улучшило бы восприятие результатов и украсило бы работу.
2. При анализе экспрессии HLA-DR на НК-клетках (стр. 91) автор разделяет доноров на две группы — те, у кого менее 5% терминально дифференцированных НК-клеток, и те, у кого их больше 5%. Почему именно 5%, автор не объясняет.
3. При оценке динамики экспрессии HLA-DR при стимуляции НК-клеток различными факторами (рис.13), практически не учитывается гибель клеток. Почему бы не использовать витальный краситель на стадии цитометрического анализа?
4. Использование аллогенных Т-клеток для изучения способности НК-клеток инициировать их активацию в ответ на микобактериальные антигены (рис.28) создает проблемы в интерпретации результатов. Не исключено, что автор имеет дело не со специфическим ответом на микобактериальные антигены, а с ответом на аллоантиген. Микобактериальные антигены в этом случае могут выполнять функцию ко-стимуляции, инициируя созревание дендритных клеток, через TLR2/4, с чем может быть связана высокая способность этих клеток стимулировать Т-лимфоциты. В случае со-культивирования НК-клеток и Т-лимфоцитов, не исключено, что следовые количества лизата микобактерий попадают в культуру вместе с НК-клетками и взаимодействуют с TLR Т-лимфоцитов (doi: 10.1016/j.coi.2006.11.007), вызывая их активацию, хотя и значительно более слабую чем в случае дендритных клеток. Следует отметить, что в эксперименте отсутствуют контроли, в которых дендритные клетки свободны от антигена, а также, в которых оценивается влияние лизата непосредственно на Т-лимфоциты. В качестве дополнительного замечания можно отметить, что на рисунке 28А отсутствуют подписи к осям, что затрудняет его понимание.
5. В разделе Заключение автор подводит канву сделанной работе, формулирует четкие и обоснованные выводы. Однако хотелось бы узнать, как автор видит практическую



реализацию полученных данных, прежде всего в направлении создания клеточных препаратов для адоптивной терапии. Краткое размышление на эту тему было бы уместно в конце раздела.

**Отзыв ведущей организации.** Отзыв положительный, содержит следующие замечания:

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<sup>+</sup> в субпопуляции CD56<sup>dim</sup>CD57<sup>+</sup> 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 огрехи в некоторых рисунках.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается их научными достижениями в областях, близких к тематике работы, а именно: исследования различных аспектов иммунного ответа, молекулярная биология иммунных клеток, исследование сигнальных молекул и рецепторов, геномный и транскриптомный анализ, что подтверждается сериями их публикаций в ведущих научных российских и международных журналах. Высокая квалификация, большой опыт исследовательской и экспертной работы оппонентов и представителей ведущей организации позволяет им объективно оценить степень научной новизны результатов диссертационной работы, её теоретическую и практическую значимость.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований определены ранее не описанные два типа HLA-DR-экспрессирующих NK-клеток, циркулирующих в крови здоровых людей: мало дифференцированные клетки HLA-DR<sup>+</sup>CD56<sup>bright</sup> и высоко дифференцированные клетки HLA-DR<sup>+</sup>CD56<sup>dim</sup>CD57<sup>+</sup>. Выявлено, что наращивание NK-клеток *in vitro* с использованием IL-2 и фидерных клеток K562-mbIL21 приводит к значительному обогащению популяции активированными клетками HLA-DR<sup>+</sup>. Подтверждена связь между экспрессией HLA-DR на NK-клетках и продукцией ими IFN $\gamma$ , в том числе показана положительная корреляционная зависимость между этими двумя параметрами. Впервые установлено, что *in vitro* экспрессия HLA-DR может запускаться IFN $\gamma$ , продуцируемым самими NK-клетками, по STAT3- и ERK1/2-зависимому пути с задействованием изоформы 3 транскрипционного регулятора СІТА. Показан функциональный ответ HLA-DR-позитивных NK-клеток на антигены микобактерий, что указывает на значимость данной популяции в иммунном ответе на туберкулез. Впервые выявлено, что HLA-DR-позитивные NK-клетки способны запускать специфическую активацию CD4<sup>+</sup> Т-клеток после предварительной инкубации с разрушенными микобактериями.



**Теоретическая значимость** работы обоснована тем, что исследования, проведенные соискателем, существенно расширяют знания о 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 о физиологии и иммунологической роли НК-клеток.

**Значение** полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что полученные в ходе работы результаты можно применить для разработки новых подходов к клеточной иммунотерапии. В том числе, предлагается эффективный метод экспансии субпопуляции НК-клеток HLA-DR<sup>+</sup>, проявляющей высокую функциональную активность. Перспективность HLA-DR-экспрессирующих НК-клеток для иммунотерапии определяется возможностью комбинированного использования их киллерной, цитокин-продуцирующей и антиген-презентирующей активностей. Кроме того, в данной работе оптимизирована методика для определения HLA-DR-зависимого антиген-индуцированного ответа Т-клеток при взаимодействии с НК-клетками, предварительно нагруженными антигенами микобактерий, которая может быть использована для тестирования ответа на другие бактериальные и вирусные антигены.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что экспериментальные данные получены на сертифицированном оборудовании, использование описанных методик обосновано, показана воспроизводимость результатов исследования. Данные получены в необходимом объеме в независимых экспериментах. Результаты исследований обработаны стандартными методами вариационной статистики в соответствии с числом сравниваемых параметров и нормальным либо ненормальным распределением данных. Произведено сравнение авторских данных с данными, опубликованными ранее по рассматриваемой тематике, выявлены сходства и приведены возможные объяснения для наблюдаемых отличий.

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном участии в планировании и проведении научных экспериментов, сборе данных, разработке новых экспериментальных методик, статистической обработке и интерпретации результатов, участии в апробации результатов исследования на российских и международных конференциях, подготовке основных публикаций. Все экспериментальные и теоретические исследования по теме диссертации проведены лично соискателем или при его непосредственном участии под руководством к.б.н. ст. науч. сотр. Коваленко Е.И., за исключением пробоподготовки образцов для РНК-секвенирования, выполненной Мерзляк Е.М. (группа структурной организации Т-клеточного иммунитета ИБХ РАН).



В ходе защиты диссертации существенных критических замечаний высказано не было. Были заданы следующие уточняющие вопросы:

- 1) В ходе анализа экспрессии HLA-DR на NK-клетках диссертант разделял доноров на 2 группы: менее 5% зрелых NK-клеток и более 5%. Какие были минимальные значения – у группы, в которой менее 5%, и какие были максимальные значения? Почему выбрали 5% для разделения?
- 2) Согласно данным диссертанта, в NK-клетках экспрессируется изоформа 3 трансактиватора СИТА. А в каких клетках, в какой момент смотрели, что это за изоформа, в свежeweделенных или активированных? На протяжении какого времени NK-клетки были активированы? Если сравнить клетки свежeweделенные, активированные в течение недели и пяти недель, может ли быть такое, что будет переключаться изоформа?

Соискатель Куст С.А. ответила на заданные ей в ходе заседания вопросы и привела собственную аргументацию:

- 1) Минимальные значения в группе 1 были около нуля, максимальные – около 3,5%. В группе 2 минимальное значение было около 5,5%, максимальное – около 20% HLA-DR-позитивных NK-клеток. Если смотреть на распределение значений процентного содержания HLA-DR<sup>+</sup> NK-клеток в зрелой субпопуляции по всех донорам, не разделяя на группы, то видно, что часть доноров ложатся в более-менее нормальное распределение, а остальные формируют растянутый «хвост», начиная от 5%. Доноров, попавших в «хвост», определили в группу 2, а тех, кто вписывался в нормальное распределение, – в группу 1. Кроме того, проанализировали другую характеристику – распределение HLA-DR<sup>+</sup> NK-клеток каждого донора по стадиям дифференцировки. В группе 1 у доноров около трети, иногда больше клеток, были CD56<sup>bright</sup>, а в группе 2 у всех доноров преобладали, иногда очень сильно, терминально дифференцированные клетки CD56<sup>dim</sup>CD57<sup>+</sup>, что подтверждало обоснованность разделения по отсечке 5%.
- 2) Экспрессию изоформы определяли в активированных цитокинами NK-клетках. Стимуляция бывала по 3 и 6 дней, здесь конкретно представлены данные через 6 дней. В теории, переключение изоформы возможно, но, например, определение изоформы в свежeweделенных NK-клетках не показало экспрессии СИТА в принципе. Для T-клеток в литературе также не описано переключение изоформы, только появление экспрессии изоформы 3 при активации.

Исходя из вышеизложенного, диссертационный совет заключает, что диссертация Куст С.А. написана автором самостоятельно и содержит новые и актуальные научные результаты и является законченной научно-квалификационной работой, результаты которой вносят важный вклад в развитие исследований в области молекулярной биологии и иммунологии. Таким образом, диссертационная работа Куст Софьи Алексеевны



«Получение, анализ свойств и иммунологической роли субпопуляции NK-клеток, экспрессирующих HLA-DR», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология, соответствует всем требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям «Положением о присуждении ученых степеней» (утверждено положением 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, 20.03.2021 г. № 426).

На заседании 20 октября 2021 г. диссертационный совет постановил: за решение научной задачи по изучению свойств и иммунологической роли HLA-DR-экспрессирующей популяции NK-клеток человека, имеющей важное значение для развития молекулярной биологии и иммунологии, присудить Куст С.А. ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 23 человек, из них 8 докторов наук (по специальности рассматриваемой диссертации 03.01.03 - молекулярная биология), участвовавших в заседании, из 30 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за - 23, против - 0, недействительных бюллетеней - 0.

Председатель  
диссертационного совета

академик РАН Иванов Вадим Тихонович

Ученый секретарь  
диссертационного совета

д.ф.-м.н. Олейников Владимир Александрович

22 октября 2021 г.

