# Отзыв

официального оппонента 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 выполненной работы**

NK-клетки являются одним из важнейших компонентов врожденной иммунной системы за счет своей способности проявлять цитотоксическую активность по отношению к перерожденным и вирус-инфицированным клеткам, а также антибактериальную и антимикотическую активность. Функциональная активность и репертуар поверхностных рецепторов NK-клеток регулируется множеством факторов. Многими исследователями было отмечено, что при длительном культивировании под воздействием определенных стимулов увеличивается доля NK-клеток, экспрессирующих HLA-DR – подтип MHC класса II. Данная молекула часто используется как маркер для регистрации активированных NK-клеток, но в немногих исследованиях были предприняты попытки оценить функциональную значимость молекулы HLA-DR для NK-клеток. Основная функция HLA-DR на других клетках связана со способностью презентировать антиген. К настоящему времени опубликован ряд работ, демонстрирующих способность NK-клеток, подобно профессиональным антиген-презентирующим клеткам, стимулировать специфичный Т-клеточный ответ на определенные антигены, однако этот аспект биологии NK-клеток несомненно еще нуждается в более тщательном изучении. Увеличение числа HLA-DR-позитивных NK-клеток в тканях и периферической крови зарегистрировано при ряде патологических состояний, включая COVID-19. Повышенная доля HLA-DR$^+$ NK-клеток, была выявлена также в легких пациентов при туберкулезной инфекции. Поскольку NK-клетки способны напрямую взаимодействовать с элементами клеточных стенок микобактерий, возникает вопрос о возможности распознавания HLA-DR$^+$ NK-клетками микобактериальных антигенов и их последующей презентации наивным Т-клеткам. В связи с этим, более углубленное исследование свойств и функциональной активности HLA-DR-экспрессирующих NK-клеток представляется актуальной задачей, поскольку характеристики данной субпопуляции мало описаны в литературе в настоящее время.

**Общая характеристика и структура диссертационной работы**

Работа построена по традиционному плану, состоит из введения, обзора литературы, включающего ссылки на работы преимущественно последних лет (199 источников, в том

числе три русскоязычных публикации и 196 публикаций в зарубежных изданиях), описания материалов и методов исследований, результатов и обсуждения, заключения и выводов. Текст диссертации изложен на 174 страницах машинописного текста, работа иллюстрирована 28 рисунками и 6 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 глубокое знание материала, опубликованного по тематике диссертации, хорошо написана и проиллюстрирована. Обзор начинается с рассмотрения биологии NK-клеток, их основных рецепторов и субпопуляций, метаболической активности и ответа на цитокины, а также описания субпопуляции «адаптивных» NK-клеток. Далее автор переходит к описанию HLA-DR-экспрессирующих NK-клеток: их встречаемости в крови и тканях в норме, при различных патологиях, регуляции экспрессии HLA-DR, функциональной активности данной субпопуляции. Особый интерес представляет раздел, в котором обсуждается возможность презентации HLA-DR$^+$ NK-клетками определенных антигенов Т-клеткам. В завершении литературного обзора приведена информация о роли NK-клеток, в том числе HLA-DR-позитивных, в иммунном ответе на туберкулезную инфекцию.

В главе 2 «**Материалы и методы**» подробно описаны все иммунологические, молекулярно-биологические и другие методы, использованные в работе. Исследования проводились на мононуклеарных клетках, NK-клетках и Т-клетках, выделенных из периферической крови человека. NK-клетки и Т-клетки обогащали с помощью отрицательной магнитной сепарации, что обеспечивало чистоту популяций не менее 97%. В работе широко применялись методики проточной цитометрии для фенотипического описания и функционального анализа клеток. Для активации NK-клеток в системе *in vitro* применялась стимуляция с помощью различных интерлейкинов, а также фидерных клеток K562, несущих на своей поверхности мембрано-связанный IL-21. Для изучения механизмов передачи сигнала использовались специально подобранные блокаторы и ингибиторы поверхностных рецепторов и внутриклеточных сигнальных молекул. Анализ функциональной активности NK-клеток производился по измерению уровня активации каспазы 6 в клетках-мишенях при инкубации с NK-клетками, либо по определению экспрессии CD107a на поверхности NK-клеток. Продукцию IFNγ и TNFα анализировали

иммуноферментным методом, либо путем внутриклеточного окрашивания и последующей цитометрии. Метаболическую активность клеток оценивали по продукции АТФ хемолюминисцентным методом, а также по количеству митохондрий методом проточной цитометрии. Экспрессию генов интереса анализировали методом ОТ-ПЦР. Для сравнения транскриптома HLA-DR-позитивных и негативных NK-клеток использовали метод РНК-секвенирования предварительно отсортированных субпопуляций.

Глава 3 «**Результаты и обсуждение**» посвящена описанию полученных данных, их обсуждению и сравнению с литературными данными, а также намечены перспективы дальнейшей работы.

В начале, диссертантом описано два пула циркулирующих в периферической крови здоровых людей 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$^{+}$. Далее было выявлено, что *in vitro*, среди всех исследованных методов стимуляции, наибольшее увеличение доли HLA-DR-позитивных NK-клеток происходит при использовании разработанной автором методики стимуляция на основе IL-2 и фидерных клеток K562-mbIL21. С точки зрения функциональных особенностей рассматриваемой субпопуляции, диссертантом была показана связь между экспрессией HLA-DR на NK-клетках и продукцией ими IFNγ *ex vivo* и *in vitro*, в том числе положительная корреляционная зависимость между этими двумя параметрами. Было показано, что при экспансии NK-клеток *in vitro* экспрессия HLA-DR ассоциирована с более интенсивной дегрануляцией по отношению к фидерным клеткам, высокой пролиферативной активностью, более высокой экспрессией рецепторов NKG2D, CD86. Далее, Куст С.А. проанализировала возможные механизмы индукции экспрессии HLA-DR и выявила, что она может запускаться не только экзогенным IL-21, но и эндогенным IFNγ, производимым самими NK-клетками. При этом, индукция экспрессии происходит по STAT3- и ERK1/2-зависимому пути через активацию изоформы 3 транскрипционного фактора CIITA.

Далее диссертантом представлены данные о том, что в крови пациентов, больных туберкулезом, доля HLA-DR$^{+}$ NK-клеток повышена по сравнению со здоровыми донорами. В экспреиментах *in vitro* показано, что в ответ на стимуляцию разрушенными бактериями *M. tuberculosis* происходит экспансия NKG2A$^{+}$CD57$^{-}$KIR$^{-}$HLA-DR$^{+}$ NK-клеток, интенсивнее продуцирующих IFNγ в ответ на микобактериальные антигены, чем HLA-DR-негативные NK-клетки. В заключении диссертантом продемонстрирована способность HLA-DR-позитивных NK-клеток запускать специфическую активацию CD4$^{+}$ Т-клеток

после предварительной инкубации с разрушенными микобактериями, но с меньшей эффективностью, чем профессиональные антиген-презентирующие клетки.

В **Заключении** суммируются основные полученные результаты и формулируются **выводы**, которые полностью соответствуют цели и задачам выполненного исследования.

**Научная новизна и научно-практическая значимость полученных результатов**

Научная новизна исследования заключается в том, что автором подробно охарактеризована субпопуляция NK-клеток, экспрессирующих HLA-DR: описаны подтипы HLA-DR$^+$ NK-клеток, циркулирующие в крови, показана связь между экспрессией HLA-DR на NK-клетках и продукцией ими IFNγ, дегрануляцией и метаболической активностью. Впервые показано, что *in vitro* экспрессия HLA-DR на NK-клетках может запускаться не только экзогенным IL-21, но и индуцированным этим цитокином эндогенным IFNγ.

Выявлено, что у больных туберкулезом доля HLA-DR$^+$ NK-клеток повышена в периферической крови, по сравнению со здоровыми людьми, и данная субпопуляция лучше отвечает на стимуляцию разрушенными микобактериями путем продукции IFNγ. Впервые продемонстрировано, что HLA-DR-позитивные NK-клетки способны запускать специфическую активацию CD4$^+$ Т-клеток после предварительной инкубации с микобактериальными антигенами.

Теоретическая значимость данной работы заключается в расширении знаний о мало описанной в литературе субпопуляции NK-клеток, экспрессирующих на своей поверхности молекулу HLA-DR. Практическая значимость связана со все возрастающей заинтересованностью в применении NK-клеток в адоптивной иммунотерапии. Существующие на данный момент способы наращивания и активации NK-клеток *in vitro* приводят к значительному увеличению доли HLA-DR-экспрессирующих клеток в культуре, что необходимо учитывать при разработке методов получения NK-клеточного терапевтического продукта. Кроме того, HLA-DR-экспрессирующие NK-клетки сами по себе могут быть рассмотрены для использования в иммунотерапии, так как потенциально могут совмещать киллерную и антиген-презентирующую активности. В данной работе предлагается эффективный метод экспансии субпопуляции NK-клеток HLA-DR$^+$ с использованием IL-2 и фидерной клеточной линии K562-mbIL21.

**Достоверность и обоснованность результатов исследования**

В диссертации Куст С.А. были использованы современные и актуальные методы исследования для решения поставленных задач, среди которых можно отметить различные приложения проточной цитометрии, РНК-секвенирование, ОТ-ПЦР, иммуноферментный

анализ, функциональные тесты на цитокин-продуцирующую и цитотоксическую активность NK-клеток. Дополнительным достоинством диссертации является то, что в качестве главного объекта исследования выступали первичные лимфоциты человека и полученные из них культуры клеток, что указывает на высокий методический уровень диссертационной работы. Данные представлены наглядно и в достаточном объеме, с использованием адекватного статистического анализа. Все вышеперечисленное дает основания считать, что полученные результаты являются достоверными, а выводы, сделанные на их основе, правомерны и логичны.

По диссертации имеются некоторые замечания.

1. Диссертация изобилует описаниями полного фенотипа исследованных субпопуляций NK-клеток. Например, «NK-клетки $CD56^{bright}HLA\text{-}DR^{+}$ меньше отличались … от клеток $CD56^{bright}HLA\text{-}DR^{-}$, чем клетки $CD56^{dim}CD57^{+}NKG2C^{+}HLA\text{-}DR^{+}$ от клеток $CD56^{dim}CD57^{+}NKG2C^{-}HLA\text{-}DR^{-}$ (рис. 10)». Такие сложные обозначения сильно затрудняют чтение и восприятие текста. Считаю, что длинные описания можно было заменить на более кратки и образные названия типа, «ранние NK-клетки», «поздние NK-клетки», «дубль-позитивны 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 $CD56^{dim}CD57^{+}$ 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 теме же, что и на рисунке 9.

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

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

**Заключение**

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.

Официальный оппонент
**Филатов Александр Васильевич,**
доктор биологических наук, профессор,
заведующий лабораторией иммунохимии
Федеральное государственное бюджетное учреждение
“Государственный научный центр “Институт иммунологии”
Федерального медико-биологического агентства
115522, Москва,
Каширское ш., 24
E-mail: avfilat@yandex.ru

15 сентября 2021 г.
Дата

Филатов
Подпись

Подпись Филатова А.В.
ЗАВЕРЯЮ
Учёный секретарь ФГБУ
“ГНЦ Институт иммунологии”
ФМБА России
Власова А.А.
“15” сентября 2021 г.