

Отзыв

официального оппонента на диссертацию **Куст Софьи Алексеевны** по теме «**Получение, анализ свойств и иммунологической роли субпопуляции НК-клеток, экспрессирующих HLADR**», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

Актуальность темы выполненной работы

В настоящее время в мировой литературе накапливается все больше данных о разнообразии репертуара и выполняемых в организме функций НК-клеток, лимфоцитов врожденного иммунитета, широко известных своей способностью распознавать и лизировать опухолевые клетки и защищать от разнообразных инфекций, в первую очередь внутриклеточных. Эти качества лежат в основе активно разрабатываемых подходов к иммунотерапии с использованием НК-клеток. Однако, для получения эффективного терапевтического продукта клетки необходимо активировать и нарастить в необходимых количествах. В связи с этим, актуальной задачей является изучение методов и механизмов активации, наращивания *in vitro* и получения функционально-активных НКклеток. В рассматриваемой диссертационной работе данная задача решается в аспекте комплексной характеристики и изучения свойств субпопуляций НК-клеток, экспрессирующих молекулу HLA-DR, подтип МНС класса II, типичной для активированных и пролиферирующих натуральных киллеров. Повышение уровня HLA-DR-позитивных НК-клеток в тканях и периферической крови отмечено при некоторых патологических состояниях, в том числе в легких при туберкулезной инфекции. Тем не менее, физиологическая значимость экспрессии в НКклетках молекулы HLA-DR, основная функция которой в некоторых других типах клеток связана со способностью презентировать антиген, до сих пор мало исследована. В данной работе показана возможность HLA-DR⁺ НК-клеток в модели с использованием антигенов *M. tuberculosis* стимулировать антиген-специфичный Тклеточный ответ. Исследование фенотипических и функциональных особенностей HLA-DR⁺ субпопуляции, взаимосвязи экспрессии HLADR с дифференцировкой и пролиферацией НК-клеток, механизма индукции экспрессии данной молекулы в НК-клетках и функциональной активности субпопуляции HLA-DR⁺, проведенное в работе, вносит вклад в понимание роли HLADR-позитивных НКклеток в иммунном ответе.

Общая характеристика и структура диссертационной работы

Диссертационная работа Куст С.А. построена по традиционному плану, включает список условных обозначений, введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, изложение результатов исследования и их обсуждение, заключение и выводы, список литературы. Работа изложена на 174 страницах, содержит 28 рисунков и 6 таблиц. Список литературы включает ссылки на 199 научных публикаций, преимущественно публикаций последних лет.

Глава «Обзор литературы» понятно и логично написана, состоит из трех основных разделов. В первом разделе дается общая характеристика НК-клеток, приведено описание их основных функциональных поверхностных рецепторов, традиционно выделяемых субпопуляций, механизмов их активации через стимуляцию цитокинами. Во втором разделе приведены имеющиеся в литературе данные по субпопуляции HLA-DR-экспрессирующих – активированных НК-клеток. Приведены сведения о HLA-DR-позитивных НК-клетках, присутствующих в человеческом организме в норме, и при различных патологиях. Затронута тема регуляции экспрессии HLA-DR и функциональных особенностей HLA-DR-экспрессирующей субпопуляции НК-клеток. В третьем разделе автор уделит внимание роли НК-клеток в иммунном ответе на *M. tuberculosis*, в том числе возможной роли HLA-DR⁺ субпопуляции. Изложенный материал дает полное представление о современном состоянии исследований в данной области.

В разделе «Материалы и методы» перечислены современные высокотехнологичные методы клеточной и молекулярной биологии, использованные в работе. Всего описано более 20 различных методик, в том числе: выделение первичных культур клеток и магнитная сепарация, проточная цитометрия, иммуноферментный и хемилюминисцентный анализы, ОТ-ПЦР, РНК-секвенирование, клеточная сортировка, функциональные тесты. В описании представлена вся необходимая информация со степенью подробности, достаточной для воспроизведения другими исследователями.

Глава «Результаты и обсуждение» содержит обширный материал экспериментальных исследований, включающий фенотипический и функциональный анализ HLA-DR⁺ НК-клеток *ex vivo*, экспансию данной субпопуляции и изучение изменения ее характеристик под воздействием различных цитокинов и фидерных клеток *in vitro*, анализ пролиферативной активности и механизма индукции экспрессии HLA-DR на НК-клетках *de novo*, анализ встречаемости HLA-DR-позитивных НК-клетках в крови пациентов с туберкулезом, изучение реакции HLA-DR⁺ НК-клеток на микобактериальные антигены и, наконец, проверку гипотезы о возможности антиген-специфичной активации Т-клеток HLA-DR-экспрессирующими НК-клетками. Полученные результаты описаны

диссертантом логически обосновано и поэтапно. Статистическая обработка данных выполнена корректно. По ходу изложения результатов, автор детально и критически анализирует полученные данные, проводит сравнение с данными литературы, а также выдвигает гипотезы и предположения, которые могут быть использованы для дальнейших исследований в этом направлении.

В главе «Заключение» автор обобщает результаты проделанной работы и формулирует соответствующие выводы, все они обоснованы и соответствуют поставленным задачам.

Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

Научная новизна и научно-практическая значимость полученных результатов

В работе получен ряд важнейших данных о фенотипических, функциональных, метаболических особенностях HLA-DR-экспрессирующей субпопуляции NK-клеток, в том числе охарактеризованы менее и более дифференцированные HLADR⁺ NK-клетки, циркулирующие в крови, показана корреляция между экспрессией HLA-DR на NK-клетках и продукцией ими IFN γ , разработана методика эффективной экспансии HLA-DR-позитивных NK-клеток в культуре. Впервые показано, что экспрессия HLA-DR на NK-клетках может стимулироваться IFN γ , который производят сами NK-клетки в ответ на IL-21.

Автором выявлена значительно увеличенная доля HLADR⁺ NK-клеток в крови пациентов с недавно диагностированным туберкулезом, а также продемонстрирована увеличенная продукция IFN γ NK-клетками в ответ на микобактериальные антигены. Помимо этого, автором впервые показано, что предварительно проинкубированные с разрушенными микобактериями туберкулеза HLA-DR-позитивные NK-клетки способны запускать специфический T-клеточный ответ, что косвенно указывает на возможность антиген-презентации данной субпопуляцией.

Работа имеет не только большое фундаментальное, но и прикладное значение, связанное с использованием NK-клеток в иммунотерапии. Высокая пролиферативная активность, продукция IFN γ , естественная цитотоксичность и потенциальная способность к антиген-презентации делают HLA-DR-экспрессирующую субпопуляцию NK-клеток привлекательной для терапевтических разработок.

Достоверность и обоснованность результатов исследования

Методическая часть работы выполнена на высоком уровне с использованием широкого набора современных экспериментальных методов, применение которых обосновано логикой исследования. Эксперименты выполнены в количестве, достаточном для получения статистически достоверных результатов. Результаты исследований обработаны корректно с использованием адекватных статистических методов. Выводы работы сформулированы четко и логически вытекают из материалов проведенного исследования. Основные результаты диссертации опубликованы в высокорейтинговых зарубежных журналах, представлены на известных российских и международных конференциях.

Несмотря на весьма высокий уровень представленной исследовательской работы, хочется высказать некоторые замечания и пожелания. 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 экспрессия 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 сокультивирования 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

T-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.

Впрочем, высказанные замечания не снижают научной ценности проделанной работы, 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

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»

119121, г. Москва,

ул. Погодинская, д. 10, стр.8

E-mail: alupatov@mail.ru

16.09.2021

Дата


Подпись



Подпись

Ученый секретарь ИБМХ с.н. Карпова Е.А.