

ОТЗЫВ

Официального оппонента, доктора медицинских наук, Литвиновой Ларисы Сергеевны на диссертацию Барковской Маргариты Шамилевны «Длина теломер на отдельных плечах индивидуальных хромосом и субпопуляционный состав Т-клеток памяти при бронхиальной астме», представленной на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.09. - Клиническая иммунология, аллергология.

Актуальность исследования

В связи с высокой распространенностью и трудностью достижения стойкой ремиссии, бронхиальная астма представляет собой глобальную проблему здравоохранения. Согласно современным представлениям, ведущая роль в развитии бронхиальной астмы принадлежит иммунной системе. При этом важное место отводится вторичному иммунному ответу, который опосредуется Т-клетками памяти. При различных видах иммунопатологии, включая бронхиальную астму, а также в процессе старения происходит накопление Т-клеток памяти в периферической крови. С этой точки зрения, актуальным представляется исследование длины теломер и пролиферативной активности Т-лимфоцитов периферической крови, которые, как и Т-клетки памяти, являются маркером преждевременного старения при развитии иммуноопосредованных заболеваний.

Данные, представленные в современной научной литературе, касаются преимущественно исследования общей популяции Т-лимфоцитов памяти при бронхиальной астме. Между тем, содержание различных субпопуляций Т-клеток памяти и наивных Т-лимфоцитов могут с большей степенью отражать изменения в иммунной системе, наблюдаемые у лиц с бронхиальной астмой. Однако, данные показатели слабо охарактеризованы в существующих научных исследованиях. Исследование длины теломер в клетках иммунной системы, хотя и широко представлено в предыдущих исследованиях, касается исключительно укорочения средней длины теломер при бронхиальной астме. Тогда как в настоящее время известно, что длина теломерных повторов на отдельных плечах индивидуальных хромосом различна и может быть охарактеризована в виде теломерного профиля.

Ввиду вышесказанного, актуальность темы, представленной в диссертационной работе Барковской М.Ш. и посвященной оценке длины теломерных повторов на отдельных плечах индивидуальных хромосом и изучению субпопуляционного состава Т-

клеток памяти при БА, не вызывает сомнения и позволяет характеризовать работу диссертанта как актуальное и перспективное исследование.

Научная новизна исследования

Научная новизна диссертационного исследования не вызывает сомнения. Модифицирован протокол методики количественной флуоресцентной гибридизации *in situ* (Q-FISH) для оценки длины теломер на отдельных плечах индивидуальных хромосом у пациентов с иммунопатологией. Разработано программное обеспечение «MeTeLen», которое позволяет проводить более точное измерение интенсивности флуоресцентного сигнала в микроизображениях Q-FISH-препаратов метафазных хромосом, что подтверждается получением свидетельства о Гос. Регистрации программы для ЭВМ.

В ходе работы впервые исследованы особенности теломерного профиля пациентов с бронхиальной астмой в сравнении со здоровыми донорами. Определены более короткие и более длинные теломерные повторы относительно средней длины теломер в метафазах. Продemonстрировано, что у пациентов с бронхиальной астмой происходит укорочение длины теломерных повторов на отдельных плечах индивидуальных хромосом, которое зависит от формы и длительности заболевания. Это позволило автору исследования сделать вывод о связи длины теломер индивидуальных хромосом с клинической гетерогенностью заболевания.

Также в работе проведено подробное фенотипическое исследование Т-клеток памяти в популяциях цитотоксических и хелперных Т-лимфоцитов, включая определение таких субпопуляций, как центральные Т-клетки памяти, эффекторные Т-клетки памяти, наивные Т-лимфоциты и терминально-дифференцированные Т-лимфоциты. Обнаружено, что относительное количество эффекторных и центральных Т-клеток памяти среди популяций CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов также зависит от формы и длительности бронхиальной астмы.

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 179 страницах и состоит из традиционных разделов: введения, обзора литературы, описания материалов и методов, главы, посвящённой результатам собственного исследования, обсуждения результатов, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена последовательно и логично, хорошо иллюстрирована, содержит 6 таблиц и 25 рисунков. В работе представлен обширный список литературы, который состоит из 285 источников, большинство из которых – зарубежные публикации (271 источник).

Во введении автор убедительно определяет актуальность исследования, формулирует цели и задачи, научную новизну, теоретическую и практическую значимости, определяет положения, выносимые на защиту.

Глава 1 представляет собой обзор литературы, который написан достаточно полно и демонстрирует хорошее владение автором теорией и глубокое понимание изучаемой научной проблематики. Описано современное представление о патогенезе бронхиальной астмы, охарактеризованы фенотипические и функциональные особенности Т-клеток памяти, перечислены существующие механизмы поддержания численности Т-клеток памяти. Подробно представлены в литературном обзоре структура и функции теломер в клетках человека, их роль в норме и при патологии, приведены все основные методы исследования длины теломер в Т-лимфоцитах человека.

Глава 2 содержит описание материалов и методов, которые были применены автором исследования для решения поставленных задач. В исследовании использованы такие современные иммунологические и молекулярно-биологические методы, как проточная цитофлуориметрия, количественная флуоресцентная гибридизация *in situ*, цитогенетический анализ. Все использованные и оптимизированные в исследовании методики, а также процедуры регистрации и последующей обработки микроизображений метафазных хромосом в программе «MeTeLen» подробно описаны, что дает возможность воспроизвести их по приведенным протоколам.

Глава 3 посвящена изложению результатов исследования и состоит из пяти разделов. В рамках работы Барковской М.Ш., при сотрудничестве с ИЦиГ СО РАН было разработано программное обеспечение для оценки длины теломер на отдельных плечах индивидуальных хромосом, которому посвящен первый раздел «результатов». Подробно изложены алгоритмы, которые применяются для определения интенсивности сигнала Q-FISH в отдельных теломерах и лежат в основе процедур нормировки и коррекции определяемого флуоресцентного сигнала.

Раздел второй главы «Результаты» описывает оптимизацию традиционного протокола методики Q-FISH. А третий раздел объединяет результаты валидации и оценки эффективности применения модифицированного протокола Q-FISH и разработанного программного обеспечения «MeTeLen» для определения длины теломер на отдельных плечах индивидуальных хромосом у лиц с иммунопатологией.

Четвертый раздел посвящен характеристике длины теломер индивидуальных хромосом при бронхиальной астме. Показано, что для экзогенной формы бронхиальной астмы характерно укорочение теломер на различных плечах индивидуальных хромосом (1p, 4q, 5q, 6p, 9p, 9q, 11q, 12q, 13q, 14q, 15q, 20q), при этом для эндогенной формы

заболевания не выявлено отличия длины теломер индивидуальных хромосом от донорских показателей. Также обнаружено, что в дебюте экзогенной формы бронхиальной астмы укорочены теломерные повторы на р и q плечах 9 хромосомы, а при длительном течении экзогенной астмы к теломерным повторам 9 хромосомы присоединяются ещё 17 укороченных теломерных повторов индивидуальных хромосом). Полученные данные свидетельствуют о том, что происходит неравномерное снижение длины теломер при аллергической бронхиальной астме и накопление укороченных теломерных последовательностей по мере увеличения длительности заболевания.

В последнем, пятом, разделе результатов представлены данные по фенотипическому составу Т-клеток памяти и наивных Т-лимфоцитов. Продемонстрировано, что в периферической крови пациентов с экзогенной формой бронхиальной астмы повышено содержание $CD4^+$ клеток памяти и субпопуляций $CD4^+62L^+$ и $CD8^+62L^+$ эффекторных Т-клеток памяти, тогда как у пациентов с эндогенной формой заболевания данные показатели не изменены. При этом, обе формы бронхиальной астмы характеризуются снижением содержания $CD4^+62L^-$ и $CD8^+62L^-$ центральных Т-клеток памяти периферической крови в сравнении с группой здоровых доноров. Показано, что содержание наивных и терминально-дифференцированных Т-лимфоцитов при бронхиальной астме не отличается от показателей здоровых доноров. Данные результаты свидетельствуют об иммунопатогенетических отличиях экзогенной и эндогенной формы бронхиальной астмы. Завершает пятый раздел исследование пролиферативной активности и содержания субпопуляций Т-клеток памяти и наивных Т-лимфоцитов в культурах ФГА-стимулированных мононуклеаров периферической крови, которое свидетельствует о сохранности пролиферативного потенциала субпопуляций Т-клеток памяти и наивных Т-лимфоцитов при бронхиальной астме.

В главе 4, «Обсуждение результатов исследования», автор последовательно обсуждает взаимосвязь полученных данных, которые представлены в результатах исследования, и сравнивает их с данными других современных исследований. Итоги работы подведены в разделе «Заключение». Работа завершается шестью выводами, которые вытекают непосредственно из представленных результатов и представлены в порядке, соответствующем очередности их выполнения. При этом, первые пять выводов отвечают задачам исследования, а последний является обобщающим.

Принципиальных замечаний, снижающих ценность представленного диссертационного исследования, нет. Работа не лишена опечаток и некоторых других неточностей. В ходе изучения диссертационной работы возникли следующие вопросы дискуссионного характера:

1. Соискателем в таблице представлены индивидуальные особенности в распределении длины теломер у здоровых доноров относительно средней длины теломер в метафазе. В связи с чем, по мнению автора, обнаруженные сходства и различия в длине теломер между здоровыми донорами и группой больных БА рассматриваются как следствие болезни, а не как индивидуальные особенности?
2. Какими механизмами можно объяснить феномен более длинных теломер на отдельных плечах индивидуальных хромосом у пациентов с БА?
3. Согласно главе 2, в каждую группу исследования были включены 15 женщин и 3 мужчины, однако далее пациентов разделили еще на подгруппы, которые включали, преимущественно, женщин. На мой взгляд, целесообразно было бы также представить вывод по полученным взаимосвязям у женщин. Как были учтены гендерные различия в исследовании?

Автореферат включает основные положения, выносимые на защиту, и его содержание полностью соответствует диссертации. Основные результаты диссертационного исследования представлены в 12 опубликованных работах, включая 3 статьи, рекомендованные ВАК РФ, а также индексируемых в базах данных Scopus и Web of Science.

Достоверность и обоснованность полученных результатов и выводов, сформулированных в диссертации

Достоверность и обоснованность данных, полученных в диссертационном исследовании, подтверждается подробным описанием объектов исследования, продуманным дизайном работы, а также приведением статистических методов, использованных для подсчета данных. Исследования проведены в соответствии с целью и задачами диссертации. Выводы диссертации в полной мере отображают результаты исследования. Подтверждением обоснованности данных также служит экспертная оценка, полученная при представлении материалов исследования на российских и зарубежных конференциях различного уровня и публикации результатов исследования в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК РФ, свидетельство о Гос. Регистрации программы для ЭВМ.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Теоретическая значимость исследования связана с полученными данными об укорочении теломерных повторов на отдельных плечах индивидуальных хромосом и изменении субпопуляционного состава Т-клеток памяти, которые свидетельствуют о более быстром старении иммунной системы пациентов с БА в сравнении со здоровыми

лицами. Полученные различия изучаемых показателей у пациентов с экзогенной и эндогенной формами астмы дополняют современные представления об отличии иммунопатогенеза клинических фенотипов данной патологии.

Практическая значимость исследования связана с потенциальным использованием показателей содержания субпопуляций Т-клеток памяти и длины теломер на отдельных плечах индивидуальных хромосом в качестве клинических маркеров различных форм бронхиальной астмы, а также как маркеров старения при иммуноассоциированных заболеваниях.

Рекомендации к дальнейшему использованию результатов и выводов диссертации

Программное обеспечение «MeTeLen» и модифицированный в ходе диссертационного исследования протокол методики Q-FISH могут быть использованы для определения длины теломер на отдельных плечах индивидуальных хромосом у здоровых лиц и пациентов с иммунопатологией.

Результаты проведенного исследования могут быть полезны для дальнейшего изучения связи укорочения теломер индивидуальных хромосом с экспрессией генов, локализованных на данных хромосомах, как механизма эпигенетической регуляции иммунной системы при аллергопатологии. Также полученные данные могут представлять интерес для преподавания курса иммунологии в медицинских и биологических ВУЗах и могут быть включены в программы клинической ординатуры и аспирантуры.

Заключение

Таким образом, представленная к защите диссертация Барковской Маргариты Шамилевны «Длина теломер на отдельных плечах индивидуальных хромосом и субпопуляционный состав Т-клеток памяти при бронхиальной астме» является самостоятельной законченной научной квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований решена важная в научном и практическом отношениях задача по изучению длины теломер на отдельных плечах индивидуальных хромосом и содержанию субпопуляций Т-клеток памяти у больных бронхиальной астмой в сравнении со здоровыми донорами. По актуальности избранной темы, новизне и значимости результатов, обоснованности научных выводов, работа Барковской М.Ш. соответствует требованиям пункта 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. №842, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а её автор достоин

присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.09 –
клиническая иммунология, аллергология.

Официальный оппонент:

Директор центра иммунологии и клеточных
биотехнологий Федерального государственного
автономного образовательного учреждения
высшего образования «Балтийский федеральный
университет имени Иммануила Канта»,
доктор медицинских наук по специальностям

14.00.16 – Патологическая физиология (Медицинские науки),

03.00.25 – Гистология, цитология, клеточная биология

(Биологические науки)

Литвинова Л.С.

«19» ноября 2019 года

Почтовый адрес: 236000, г. Калининград, ул. Гайдара, 6, каб. 302.

Тел. +7(4012) 595-595/6631. E-mail: larisalitvinova@yandex.ru

Сайт: <https://www.kantiana.ru/>

