

О Т З Ы В

официального оппонента доктора медицинских наук
Повещенко Ольги Владимировны на диссертационную работу
Олейник Екатерины Александровны: «Характеристика клеточного
иммунного ответа, индуцированного дендритными клетками, нагруженными
антигенами вируса гепатита С», представленную на соискание ученой
степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.09 –
клиническая иммунология, аллергология

Актуальность

Хронический гепатит С (ХГС) представляет глобальную проблему здравоохранения. Существующие в настоящее время методы лечения являются дорогостоящими и имеют ряд серьезных ограничений. Согласно современным представлениям, элиминация вируса и исход в выздоровление при острой HCV-инфекции обусловлен запуском сильного мультиэпитопного ответа CD8⁺ и CD4⁺ Т-клеток. При этом ключевая роль в индукции HCV-специфического Т-клеточного ответа отводится дендритным клеткам (ДК). Недостаточность иммунного ответа у больных, инфицированных HCV, обусловленная, в том числе дефектностью ДК, рассматривается в качестве одной из ведущих причин хронизации вирусной инфекции. Эти данные диктуют необходимость дальнейших исследований параметров антигенспецифического Т-клеточного ответа у больных ХГС, изучения механизмов Т-клеточных дисфункций и разработки подходов к индукции эффективного Т-клеточного ответа. Соответственно, работа Олейник Е.А., посвященная изучению *in vitro* и *ex vivo* способности дендритных клеток, нагруженных рекомбинантными белками вируса гепатита С, стимулировать антигенспецифический клеточный ответ, представляется несомненно актуальной и имеет фундаментальное и прикладное значение.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Обоснованность научных положений и выводов не вызывает сомнений. Исследования проведены в полном соответствии с поставленными целью и задачами диссертации. Автором на достаточном материале изучена способность ДК, нагруженных вирусными белками, стимулировать антигенспецифические клеточные реакции *in vitro*. Кроме того, исследования *ex vivo* позволили охарактеризовать индуцированный ДК HCV-специфический клеточный ответ у больных ХГС. Работа проведена на высоком методическом уровне с использованием современных иммунологических методов, включая многоцветную проточную

цитофлюориметрию, радиометрический и иммуноферментный анализ, сепарацию и культивирование клеток. Автор использует адекватные методы статистической обработки. Обращает внимание на качественное проведение клинических исследований. Иммунологический мониторинг включает комплексную оценку нескольких функциональных параметров антигенспецифического ответа (пролиферация, продукция Th1/Th2 цитокинов и дегрануляция CD8⁺ Т-клеток) в комплексе с оценкой митогенной реактивности и содержания регуляторных Т-клеток в динамике иммунотерапии. При этом следует отметить личное участие автора не только в проведении иммунологических исследований, но и клинической апробации иммунотерапии (рекрутирование и клинико-лабораторная оценка состояния пациентов). Научные положения и выводы, сформулированные в диссертации, заслуживают доверия, поскольку результаты исследования обсуждены на научных конференциях и опубликованы в рецензируемых журналах. Положения, выносимые на защиту, базируются на полученных результатах. Выводы диссертации в полной мере отражают результаты исследований.

Достоверность и новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Научная новизна работы заключается в том, что при исследовании способности ДК индуцировать HCV-специфический иммунный ответ автором анализируется популяция ДК моноцитарного происхождения, генерируемых в присутствии интерферона-α (ИФН-ДК), а в качестве антигенов используются усеченные фрагменты рекомбинантных белков Core и NS3. Поскольку эффективность данного типа ДК, а также комбинации рекомбинантных HCV белков Core (1-120) и NS3 (1192-1457) для нагрузки ДК ранее не исследовалась, то полученные Е.А. Олейник результаты характеризуются научной новизной. Автором получены новые данные об отсутствии ингибирующего действия белков Core (1-120) и NS3 (1192-1457) на созревание и стимуляторную активность ИФН-ДК и показана способность ИФН-ДК, нагруженных этими антигенами (ДКCore/NS3), стимулировать *in vitro* HCV-специфические клеточные реакции в культурах аутологических моноклеарных клеток (МНК) серонегативных доноров и больных ХГС. Кроме того, в работе впервые продемонстрировано, что иммунотерапия с использованием ИФН-ДКCore/NS3 позволяет индуцировать или усилить Core- и NS3-специфический ответ у пациентов с ХГС, и противовирусная терапия рибаверином в комбинации с интерфероном-α не подавляет развития антигенспецифического ответа.

Научно-практическая значимость

Научная значимость представленной работы заключается в расширении знания о влиянии рекомбинантных белков Core (1-120) и NS3 (1192-1457) HCV (генотипа 1) на созревание и функции ИФН-ДК и способности ИФН-ДК индуцировать антигенспецифические клеточные реакции, в том числе у больных ХГС. Продемонстрированные автором различия в HCV-специфическом ответе у отдельных пациентов по типу клеточных реакций, выраженности, времени манифестации и устойчивости ответа свидетельствует о выраженной разнородности пациентов с хронической HCV-инфекцией. Кроме того, выявление обратной корреляционной связи между репликацией вируса и NS3-индуцированным ответом после иммунотерапии является аргументом в пользу значимости NS3-специфических Т-клеток в сдерживании вирусной репликации. Практическая ценность работы заключается в обосновании и разработке нового подхода к активации HCV-специфического ответа у больных ХГС (патент №2637631 РФ) и его клинической апробации, а также обоснованием целесообразности сочетания иммунотерапии с противовирусными препаратами, поскольку именно такой режим позволяет добиться раннего вирусологического ответа у большинства пациентов.

Конкретные рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации

Материалы диссертации могут использоваться в программах преподавания иммунологии в медицинских и биологических ВУЗах. Полученные результаты могут быть также включены в программы клинической ординатуры и аспирантуры. Полученные результаты являются научным обоснованием для дальнейшей апробации иммунотерапевтических подходов с использованием дендритных клеток в комплексном лечении хронического гепатита С.

Оценка содержания диссертации и ее завершенности

Диссертация написана в традиционном стиле: изложена на 133 страницах: состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, 4 глав собственного исследования, обсуждения, заключения и выводов; хорошо иллюстрирована (21 рисунок и 17 таблиц). Прилагаемая библиография содержит ссылки на 191 литературный источник.

Во введении автор обосновывает выбор темы, привлекая внимание к факту недостаточной изученности ДК, генерируемых в присутствии интерферона-α (ИФН-ДК), и отсутствии данных о способности ИФН-ДК индуцировать HCV-специфический Т-клеточный ответ. Цель сформулирована четко, поставленные задачи адекватны поставленной цели.

Положения, выносимые на защиту, отражают наиболее существенные результаты проведенного исследования.

Обзор литературы изложен на 29 страницах текста, посвящен современным аспектам иммунопатогенеза вирусного гепатита С и роли ДК. В этом же разделе анализируются возможные причины несостоятельности иммунной системы, приводящей к персистенции вируса. Отдельные разделы посвящены терапевтическому потенциалу ДК и особенностям ДК, генерированных *in vitro* в присутствии интерферона- α . Включение в анализ литературы публикаций последних лет позволяет достаточно полно осветить состояние проблемы и вникнуть в суть научной основы диссертации. Обзор литературы логично подводит к цели и задачам, сформулированным автором.

В главе «Материалы и методы исследования» представлены данные, подробно характеризующие объект и методы исследования. Общее количество обследованных составляет 90 человек, включая 52 донора крови и 38 больных хроническим вирусным гепатитом С. Автором описаны все использованные в работе культуральные и иммунологические методы исследования, детали генерации ДК *in vitro*, приведены характеристики пациентов, включенных в апробацию иммунотерапии, и описаны протоколы клинических исследований. Избранные автором методы исследований вполне современны и адекватны поставленным задачам.

В пяти разделах главы 3 описаны собственные результаты. Первый раздел посвящен изучению влияния рекомбинантных вирусных белков на созревание и функциональную активность ИФН-ДК. Автором показано, что преинкубация ИФН-ДК с белками Core (1-120) и NS3 (1192-1457) не подавляет созревание и стимуляторную активность ДК, что обосновывает возможность использования указанных белков в качестве антигенов для нагрузки ДК в дальнейших исследованиях. Далее (раздел 2 и 3) исследуется способность ИФН-ДК, нагруженных вирусными белками, индуцировать антигенспецифический клеточный ответ в культуре аутологичных МНК. Автором продемонстрировано, что ДКCore/NS3 серонегативных доноров обладают способностью стимулировать пролиферацию, продукцию IFN- γ и дегрануляцию CD8+CD107a+ Т-клеток, и что ДК больных ХГС в целом сохраняют способность индуцировать антигенспецифический ответ в аутологичных культурах МНК. Раздел 4 посвящен оценке *ex vivo* HCV-специфического иммунного ответа у больных ХГС на фоне иммунотерапии с использованием ИФН-ДК. Результаты этого фрагмента исследований свидетельствуют, что иммунотерапия в режиме монотерапии стимулирует развитие или усиление антигенспецифического ответа, судя по возрастанию пролиферации, продукции IFN- γ и дегрануляции CD8 Т-клеток в культурах

МНК при стимуляции Core и NS3 белками. В этом же разделе приводится подробная характеристика антигенспецифического ответа с анализом средних и индивидуальных показателей, характеризующих Core- и NS3-специфический ответ. Исследование иммунного ответа отдельно на Core- и NS3-антигены в динамике терапии позволяет проанализировать не только тип клеточных реакций, но и сравнить выраженность Core- и NS3-специфического ответа. Наряду с антигенспецифическим ответом автор оценивает показатели митогенной реактивности и содержание CD4+CD25+CD127- регуляторных Т-клеток, что позволяет сделать заключение о влиянии иммунотерапии на «неспецифическую» реактивность Т-клеток и генерацию регуляторных Т-клеток. Важным моментом данного раздела является анализ вирусологического ответа, который, с одной стороны, свидетельствует о способности NS3-индуцированных Т-клеток сдерживать репликации вируса, а с другой, – о недостаточности Т-клеточного ответа для полной элиминации вируса (выраженное и стойкое снижение вирусной нагрузки зарегистрировано только у 20% пациентов). Это дает автору основание предположить, что для элиминации вируса необходима комбинация иммунотерапии с противовирусными препаратами. Проверке этого предположения посвящен раздел 5, в котором анализируется развитие антигенспецифического и вирусологического ответа при проведении комбинированной терапии. Показано, что противовирусная терапия (рибавирин в сочетании с интерфероном-α) несмотря на умеренное подавление митогенной реактивности Т-клеток не отменяет развития антигенспецифического ответа (судя по усилению Core- и NS3-специфической пролиферации и дегрануляции CD8+Т-клеток в динамике комбинированной терапии). Особенностью ответа в этом случае является более высокая выраженность NS3-специфического пролиферативного ответа и достижение быстрого вирусологического ответа у большей части пролеченных пациентов. Результаты собственных исследований изложены понятно, последовательно и аргументированно.

В разделе «Обсуждение» автор подвергает полученные результаты полноценному осмыслению и обсуждению с анализом итогов научной работы в сопоставлении с данными литературы.

Итоги работы подведены в разделе «Заключение». Выводы (6) вытекают из основных положений диссертации и соответствуют поставленным задачам.

В целом, диссертационную работу Е.А. Олейник можно оценить как существенное дополнение к исследованиям последних лет. К достоинствам диссертационной работы Олейник Е.А. можно отнести качественный анализ

и проработку данных литературы, позволяющий в полной мере судить о состоянии научных исследований в указанной области. Работа также импонирует постановкой и решением задач, имеющих как фундаментальный, так и прикладной характер.

В качестве замечания можно отметить наличие в работе некоторых стилистических и орфографических погрешностей, которые однако имеют непринципиальный характер и не снижают общей положительной оценки работы.

В качестве дискуссии хотелось бы задать автору ряд вопросов:

1. В главе 3 показано, что нагруженные одновременно двумя белками ДК пациентов с хроническим гепатитом С, индуцируют более выраженный антигенспецифический клеточный ответ, чем ДК, нагруженные только одним антигеном (Core или NS3). В динамике проведения ДК-вакцинации оценивалось отдельное влияние Core или NS3 антигенов на функциональное состояние клеток. С чем связан данный подход?

2. Чем вы объясните отрицательную корреляционную связь между уровнем NS3- пролиферации с NS3- специфической дегрануляцией и уровнем секреции IFN- γ до проведения вакцинотерапии?

3. Имеет ли преимущества вакцинотерапия нагруженными антигенами ДК перед ДК трансфецированными вирусными антигенами?

Автореферат полностью отражает содержание диссертации. Основные положения, выносимые на защиту, и результаты диссертационного исследования представлены в 7 опубликованных работах, включая патент и статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ, а также индексируемых в базах Scopus и Web of Science.

Диссертационная работа по своему содержанию полностью соответствует специальности 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология.

Заключение

Таким образом представленная к защите диссертация Олейник Екатерины Александровны «Характеристика клеточного иммунного ответа, индуцированного дендритными клетками, нагруженными антигенами вируса гепатита С» является самостоятельной законченной научно-квалификационной работой, в которой решена важная в научном и практическом отношении задача – продемонстрирована принципиальная возможность индукции иммунного ответа с помощью дендритных клеток и охарактеризованы параметры клеточного ответа у больных хроническим гепатитом С. По своей актуальности, методическому уровню, научной новизне, теоретической и практической значимости квалификационная

работа 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 ее автор достоин присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.09 – Клиническая иммунология, аллергология.

Официальный оппонент

Заведующая лабораторией клеточных технологий «Научно-исследовательского института клинической и экспериментальной лимфологии», филиала Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики» Сибирского отделения Российской академии наук», доктор медицинских наук
(по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология)

Повещенко Ольга Владимировна

Повещенко О.В.

Почтовый адрес: 630060, г. Новосибирск, ул. акад. Тимакова, д. 2

Тел.: +7 (383) 333-64-09

Сайт: <http://www.niikelsoramn.ru>; E-mail: lymphology@niikel.ru

Адрес электронной почты poveschenkoov@yandex.ru

Подпись д.м.н. Повещенко Ольги Владимировны ЗАВЕРЯЮ

Ученый секретарь Власова Н.В. 10 декабря 2018 г.

