

О Т З Ы В

официального оппонента доктора медицинских наук, профессора, заслуженного деятеля науки РФ Ширшева Сергея Викторовича 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

Актуальность темы диссертационной работы Е.А.Олейник обусловлена большой медико-социальной значимостью хронического гепатита С (ХГС) и важной ролью иммунной системы в ограничении репликации вируса. Хронический гепатит, обусловленный вирусом гепатита С (HCV), представляет большую проблему во всем мире в силу широкой распространенности, неуклонного роста заболеваемости, отсутствия профилактических вакцин и доступных для пациентов эффективных методов лечения. Используемая в терапии ХГС противовирусная терапия имеет ряд серьезных ограничений и эффективна только в половине случаев и только у больных инфицированных вирусом генотипа 1. Поэтому научное обоснование и разработка новых подходов к лечению хронической HCV-инфекции представляется исключительно важной задачей. Ведущая роль в элиминации вируса отводится адаптивному иммунному ответу, тогда как хронизацию инфекции связывают со слабым и неустойчивым Т-клеточным ответом. Соответственно, активация противовирусного иммунного ответа рассматривается в качестве важной патогенетической составляющей в комплексном лечении ХГС. При этом учитывая важную роль дендритных клеток (ДК) в индукции антигенспецифического иммунного ответа, изучение

способности ДК, нагруженных вирусными антигенами, стимулировать Т-клеточный ответ представляется, безусловно, перспективным направлением исследований как в научном, так и прикладном аспектах. Целью диссертационной работы Е.А. Олейник является изучение *in vitro* и *ex vivo* способности IFN- α - индуцированных ДК, нагруженных рекомбинантными белками вируса гепатита С, стимулировать антигенспецифический клеточный ответ. Для достижения цели решались пять задач, которые адекватны поставленной цели, четко сформулированы и отражают суть проведенных исследований.

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

Научные положения, выносимые на защиту, а также представленные в диссертационной работе выводы, обоснованы грамотным дизайном и достаточным фактическим материалом, полученным в результате исследований *in vitro* и *ex vivo*. Эти исследования проведены в полном соответствии с поставленными целью и задачами диссертации. Обращает внимание использование современного оборудования и адекватных методических подходов. Исследования проведены на автоматизированных системах детекции – проточной цитофлюориметрии, радиометрическом анализе, иммуноферментном анализе. Для оценки ответа автор исследовала одновременно несколько параметров – пролиферацию моноуклеарных клеток, продукцию Th1 и Th2 цитокинов и эффекторную функцию цитотоксических Т-клеток в ответ на стимуляцию ДК, нагруженными вирусными антигенами или непосредственно вирусными белками. Дополнительно были оценены неспецифические реакции (митогенная реактивность, генерация регуляторных Т-клеток). Помимо исследований *in vitro* в рамках научных поисковых исследований автором также

проанализированы параметры иммунного ответа *ex vivo* на фоне иммунотерапии ИНФ-ДК. Рекрутирование пациентов проводилось с учетом критериев «включения» и «исключения». Клинические и иммунологические исследования дополнены оценкой противовирусного ответа. Автор умело обобщает и анализирует результаты с использованием современных методов статистической обработки данных. Содержание диссертационной работы изложено последовательно и логично в соответствии с поставленными задачами. Положения, выносимые на защиту, вытекают из полученных результатов. Выводы диссертации логически обоснованы и отражают результаты исследований.

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

Достоверность исследования несомненна. Она определяется достаточным объемом и качеством проведенных исследований. В исследование включены 90 человек, в том числе 52 донора крови и 38 больных с хроническим вирусным гепатитом С. При этом исследования *ex vivo* включают 4-кратное обследование пациентов на различных временных точках. Научные результаты, изложенные в диссертационной работе, получены автором самостоятельно. Достоверность обусловлена также высоким методическим уровнем диссертационной работы, использованием современных методов лабораторных исследований и диагностики. Автор лично участвовал в разработке структуры исследования, рекрутировании пациентов и проведении иммунологических исследований. Подтверждением обоснованности данных является также научная экспертная оценка, полученная при представлении материалов исследований на конференциях, симпозиумах и конгрессах различного уровня (региональные, всероссийские,

европейские), а также публикации материалов в рецензируемых журналах, получен патент.

Новизна исследования, обусловлена прежде всего тем, что для индукции антигенспецифического иммунного ответа автор использует ДК, генерируемые из моноцитов в присутствии ИФН- α . Кроме того, автором использовалась новая композиция антигенов – комбинация усеченных фрагментов рекомбинантных белков Core (1-120) и NS3 (1192-1457). Исследования, посвященные изучению возможности ДК индуцировать противовирусный иммунный ответ у больных ХГС, представлены единичными публикациями, в которых в качестве клеточной платформы используются ДК, генерированные в присутствии ГМ-КСФ и ИЛ-4. В то же время данные о способности ИФН-ДК активировать HCV-специфические клеточные реакции *in vitro* и *in vivo* до настоящего времени отсутствуют. Поэтому все полученные автором результаты являются новыми.

Автором впервые продемонстрировано отсутствие негативного влияния рекомбинантных белков Core (1-120) и NS3 (1192-1457) на созревание и функциональную активность ИФН-ДК. В диссертационной работе получены новые данные о способности ИФН-ДК индуцировать *in vitro* Core- и NS3-специфические клеточные реакции, в частности, пролиферативный ответ, продукцию IFN- γ и активацию цитотоксических Т-лимфоцитов в культурах моноклеарных клеток (МНК) серонегативных доноров и пациентов с ХГС. Более того, впервые показано, что иммунотерапия ИФН-ДК (в виде монотерапии) индуцирует у пациентов с ХГС Т-клеточный ответ, который проявляется возрастанием пролиферации, продукции IFN- γ и дегрануляции CD8 Т-клеток при стимуляции МНК пациентов Core и NS3 белками. Характерно, что индукция Th1 ответа и активация цитотоксических Т-клеток, не сопровождалась индукцией Th2 ответа и генерацией CD4⁺CD25⁺CD127⁻ регуляторных Т-клеток (Treg). Соискателем также показано, что противовирусная терапия (в комбинации с иммунотерапией) не оказывает

ингибирующего эффекта на развитие антигенспецифического иммунного ответа.

Значимость для медицинской науки и практики полученных результатов

Полученные результаты носят фундаментальный характер, поскольку расширяют представления о влиянии усеченных рекомбинантных HCV белков на созревание и функции ИФН-ДК, а также о функциях антигенспецифических Т-клеток у больных ХГС. Выявленная индивидуальная гетерогенность HCV-специфических ответов по типу клеточных реакций, их выраженности и устойчивости у больных ХГС указывает на разные механизмы иммунопатогенеза у пациентов с хронической HCV-инфекцией. Кроме того, продемонстрированная автором обратная корреляционная связь между силой Core и NS3-специфического ответа и уровнем вирусной нагрузки у пациентов с хроническим гепатитом С после проведения иммунотерапии, подтверждают значимость специфического Т-клеточного ответа в контроле за репликацией вируса гепатита С у больных ХГС.

Практическая значимость исследования заключается в обосновании возможности использования ДК для стимуляции антигенспецифического ответа у больных ХГС. Важность этого фрагмента исследований заключается также в том, что автором проанализирован не только иммунный ответ, но и противовирусный ответ. Это позволило сделать заключение, согласно которому иммунотерапия в виде монотерапии является недостаточной для элиминации вируса, однако в комбинации с противовирусной терапией повышает эффективность противовирусного лечения у большинства пациентов.

Конкретные рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации

Материалы диссертации рекомендуется использовать в преподавании иммунологии в учебном процессе медицинских и биологических ВУЗов, а также в программах послевузовского образования (клиническая ординатура, аспирантура). Полученные результаты являются научным обоснованием для дальнейшей апробации иммунотерапии с использованием дендритных клеток в комплексном лечении хронического гепатита С.

Содержание диссертации, и ее завершенность в целом

Представленная диссертация построена по классическому плану и содержит введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты собственных исследований, обсуждение результатов, заключение и выводы. Работа изложена на 133 страницах машинописного текста, иллюстрирован 21 таблицей и 17 рисунками. Библиографический указатель включает 191 источник. Во введении автор аргументирует актуальность темы и важность исследований HCV-специфического иммунного ответа, стимулированного с помощью ДК, генерируемых в присутствии интерферона- α (ИФН-ДК), у больных хроническим гепатитом С. В обзоре литературы представлены современные данные об иммунных механизмах защиты от вируса гепатита С, нарушении Т-клеточных функций у больных ХГС, роли ДК в индукции антигенеспецифического ответа и обосновании необходимости восстановления Т-клеточного ответа, как патогенетической составляющей терапии ХГС. Материалы обзора изложены логично, профессиональным языком, что свидетельствует о глубоком осмыслении проблемы. В главе «Материалы и методы» автор описывает дизайн исследования, приводит подробную характеристику групп обследованных пациентов, останавливаясь,

в том числе, на описании клинических данных, детально описывает использованные в работе методы исследования.

В главе «Результаты собственных исследований» автор последовательно описывает полученные в процессе работы данные, приводит их сравнительный анализ и сопоставления, делает обоснованные заключения. В первом разделе оценивается влияние вирусных Core и NS3 белков на фенотипические и функциональные свойства ДК. Автором анализируются поверхностные маркеры ДК и их стимуляторная активность. Полученные данные свидетельствуют, что кратковременная преинкубация ИФН-ДК с рекомбинантными HCV белками, кодируемыми усеченными фрагментами генов Core (1-120) и NS3 (1192-1457), не подавляет экспрессию дендритными клетками антигенпрезентирующих, костимуляторных и активационных молекул, а также не ингибирует аллостимуляторную и Th1/Th2 стимулирующую активность ДК, что указывает на отсутствии супрессорного влияния указанных белков. Во втором разделе изучается способность ИФН-ДК доноров стимулировать *in vitro* антигенспецифические клеточные реакции (пролиферацию, продукцию IFN- γ и дегрануляцию CD8 Т-клеток). Показано, что ИФН-ДК серонегативных доноров, нагруженные Core и NS3 белками (ДК_{Core/NS3}), индуцируют *in vitro* более высокие уровни пролиферации, продукции IFN- γ и дегрануляции CD8 Т-клеток по сравнению с ответами, стимулированными контрольными ДК (не нагруженными указанными антигенами), на основании чего делается заключение о способности ДК_{Core/NS3} индуцировать антигенспецифические клеточные реакции. В третьем разделе анализируется способность ДК индуцировать HCV-специфический клеточный иммунный ответ у пациентов с ХГС. Оценка проводилась по таким же параметрам, как и у доноров. Показано, что ДК_{Core/NS3} пациентов с ХГС также способны стимулировать пролиферативный ответ, продукцию IFN- γ и дегрануляцию CD8 Т-клеток, в культурах аутологичных МНК. Это свидетельствует о сохранении антигенпрезентирующей и стимулирующей

функций ИФН-ДК при хронической HCV-инфекции. Четвертый раздел посвящен анализу индукции антигенспецифического ответа у больных ХГС на фоне иммунотерапии, проводимой в виде монотерапии. Автором показано, что иммунотерапия пациентов с использованием ДК_{Core/NS3} сопровождается возрастанием пролиферации, продукции IFN- γ и дегрануляции CD8 Т-клеток при стимуляции МНК пациентов вирусными белками Core и NS3. Кроме того, наблюдается восстановление ответа Т-клеток на митоген в отсутствии усиления продукции Th2 (IL-4, IL-6) цитокинов и экспансии Treg клеток. В результате автор делает заключение о способности ИФН-ДК стимулировать *in vivo* HCV-специфический иммунный ответ у пациентов с ХГС. В этом разделе автор также демонстрирует отсутствие тяжелых нежелательных явлений и хорошую переносимость иммунотерапии. При этом показано, что Core/NS3-специфический пролиферативный ответ и активация цитотоксических Т-клеток наблюдаются уже после первого курса вакцинаций, причем Core-индуцированный ответ более выражен, чем ответ на NS3. В то же время усиление продукции IFN- γ в ответ на стимуляцию Core и NS3 происходит только после второго курса вакцинаций. При анализе индивидуальных данных автором подчеркивается, что иммунотерапия ДК_{Core/NS3} вызывает развитие антигенспецифического иммунного ответа у всех пациентов, хотя параметры ответа (тип клеточных реакций, их выраженность и продолжительность ответа) характеризуется выраженной индивидуальностью. Также автором проводится оценка противовирусного ответа и демонстрируется, что монотерапия ДК_{Core/NS3} не приводит к элиминации вируса. Стойкое снижение вирусной нагрузки на 1 порядок регистрируется только у 20% пациентов. Тем не менее, между вирусной нагрузкой и уровнем NS3-специфического ответа (пролиферация и продукция IFN- γ) регистрируется обратная корреляция, свидетельствующая о роли NS3-специфического клеточного ответа в ограничении репликации вируса. Эти данные являются обоснованием для апробации вакцинотерапии в комбинации

с противовирусными препаратами. Результатам такой комбинированной терапии посвящен раздел 5. Показано, что несмотря на подавление митогенной реактивности Т-клеток на фоне противовирусной терапии вакцинация ДК_{Core/NS3} в сочетании с интерфероном и рибавирином приводит к усилению пролиферативного ответа и дегрануляции CD8 Т-клеток в ответ на стимуляцию МНК рекомбинантными белками Core и NS3. Эти данные, по мнению автора, свидетельствуют об отсутствии ингибирующего действия противовирусной терапии на способность ИФН-ДК индуцировать HCV-специфический иммунный ответ. Кроме того, в данном разделе продемонстрировано, что комбинированная терапия позволяет достичь быстрого антивирусного ответа у большинства (86%) пациентов, тогда как антивирусный ответ на противовирусные препараты по данным литературы отмечается только у половины пациентов.

В главе «Обсуждение результатов» автор проводит всесторонний анализ данных с точки зрения современных взглядов на роль ДК в патогенезе ХГС и их иммунотерапевтического потенциала. В главе заключение автор подводит итог проведенных исследований, обсуждает функциональную полноценность ИФН-ДК больных ХГС в плане индукции иммунного ответа и обосновывает целесообразность иммунотерапии в комплексном лечении ХГС. Шесть выводов работы, сформулированных на основании полученных данных, полностью отражают основное содержание работы и соответствуют поставленным задачам.

Достоинством работы Олейник Е.А. является получение результатов, имеющих как фундаментальное, так и прикладное значение. Хочется также отметить глубокую научную проработку темы и качественное представление имеющихся в литературе данных, что позволяет получить полное представление о состоянии изучаемой научной проблемы.

Автореферат полностью отражает материал, изложенный в диссертации. Опубликованные автором 7 работ, включая 3 статьи в журналах,

рекомендованных ВАК РФ для публикации материалов диссертационных работ, 1 статью, индексируемую в базе WoS, и один патент в полной мере отражают основные положения и результаты диссертационного исследования.

Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология и теме исследования. Поставленные автором задачи в полной мере решены.

Вместе с тем по оппонируемой работе имеется ряд замечаний и вопросов:

1. В работе имеются стилистические и орфографические погрешности. Много аббревиатур одного значения в англо- и русскоязычных вариантах, например, встречаются разные обозначения одного и того же вируса или процесса: вирус гепатита С, обозначается как HCV и ВГС; HCV-инфекция и ВГС-инфекция и пр.

2. На мой взгляд «список сокращений» составлен неудачно. Во-первых, приводятся сокращения, которые не имеет смысла расшифровывать, например – Ig, БВО – быстрый вирусологический ответ (что это такое непонятно), ДК-вакцина (если ДК уже расшифрована), ПК – периферическая кровь. Особенно это относится к аббревиатурам интерферонов. Дважды дается расшифровка фактора некроза опухоли. В то же время, такие аббревиатуры, как BDCA, RIG-1, MDA5, АЛТ, FoxP3, STAT, TRIF, IRS, SOCS3, ICAM не внесены в список сокращений.

3. В тексте встречаются понятийные неточности: HCV эпитопы (вместо эпитопы антигенов HCV), «Генетическая изменчивость HCV обусловлена высокой вариабельностью белков...в следствие частых замен аминокислотных остатков»..., «У пациентов с ХГС вирусные мутации присутствуют в 50% всех эпитопов...» (стр. 20) и пр. Кроме того, встречаются забавные словосочетания: «гетерогенность пациентов» (стр. 8) или на стр. 9 – «иммунопатогенетическая разнородность пациентов»,

«предлеченность пациентов» (стр. 32). В работе неоправданно много англоязычных заимствований, которые мешают понять суть излагаемой проблемы, и зачастую не совсем корректны.

4. В подглаве 3.4.2. Индукция иммунного ответа у пациентов с ХГС в динамике иммунотерапии ИФН-ДК, соискатель оценивала антигенспецифический иммунный ответ, но в отличие от предыдущих постановок *in vitro*, в качестве антигенного материала добавлялись не ИФН-ДК, примированные антигенами, а просто антигены Core и NS3, что не позволяет оценить данные результаты как специфический ответ поскольку Т-лимфоциты из МНК пациентов могут специфически реагировать на антигены только в контексте молекул МНС. Скорее всего, в данном случае, активация Т-клеток осуществлялась через молекулы TLR.

Вопросы:

- Насколько целесообразно при ХВГ-С использовать ДК-вакцины, если известно, что цитопатогенный эффект связан не с вирусом гепатита С, а с ЦТЛ?
- Как дифференцировать «инфицированность» ДК нецитопатогенным вирусом от «невосприимчивости» ДК к вирусу, если и в первом и во втором случаях ДК выполняет свою антигенпрезентирующую функцию?
- Как можно объяснить отсутствие мутаций ВГС у пациентов с «...исходом в выздоровление...» (стр.21), если квазивиды, формирующиеся в результате мутаций – это конститутивный признак ВГС в силу отсутствия у вируса корректирующей-3',5'-экзонуклеазной активности?
- Какова причина появления корреляции между пролиферативным ответом и IFN- γ секреторной активностью, с одной стороны, и дегрануляцией ЦТЛ и IFN- γ секреторной активностью, с другой стороны, спустя 6 мес. после иммунотерапии ИФН-ДК, нагруженных антигенами ВГС?
- Можно ли IL-2 считать адъювантом, и не усилит ли его введение генерацию Treg?

- Какова вероятность попадания Core/NS3 позитивных МНК от пациентов с ВГС-инфекцией в пул клеток для их генерации *in vitro* в ИНФ-ДК и как это может отразиться на иммуногенности клеточной вакцины?

Данные замечания и вопросы имеют непринципиальный характер и не снижают общей положительной оценки работы. Принципиальных замечаний к диссертации нет. Кроме того, хочу отметить, что проделана большая, глубоко продуманная работа, результаты которой и подходы безусловно будут востребованы для получения ДК-вакцин при других вирусных инфекциях. Получение клеточных аутовакцин как для профилактики, так и иммунотерапии не только отражают грамотный патогенетический подход, но и являются ярким примером «персонифицированной» медицины, которая всегда была присуща отечественной медицине и выражалась в известной фразе: «лечат не болезнь, а больного».

Заключение

Диссертационная работа Олейник Екатерины Александровны «Характеристика клеточного иммунного ответа, индуцированного дендритными клетками, нагруженными антигенами вируса гепатита С», представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология, является самостоятельной законченной научно-квалификационной работой, в которой на основании проведенных *in vitro* и *ex vivo* исследований решена важная в научном и практическом отношении задача - охарактеризованы параметры Т-клеточного ответа, стимулированного с помощью интерферон-α-индуцированных дендритных клеток, нагруженных рекомбинантными Core и NS3 белками, что имеет важное научное и практическое значение для медицины в целом и иммунологии в частности.

Квалификационная работа по своей актуальности, методическому уровню, научной новизне, теоретической и практической значимости

соответствует требованиям п.9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, Олейник Екатерина Александровна заслуживает присуждения ей ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология.

Официальный оппонент:

заведующий лабораторией иммунорегуляции Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук (ИЭГМ УрО РАН) Федерального государственного бюджетного учреждения науки Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН, доктор медицинских наук по специальности 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология, профессор, Заслуженный деятель науки РФ,
Ширшев Сергей Викторович

Адрес: 614081, г. Пермь, ул. Голева, д. 13.

тел. (342) 280-84-31.

e-mail: Shirshhev@iegm.ru

Подпись д.м.н., профессора, Заслуженного деятеля науки РФ Ширшева Сергея Викторовича ЗАВЕРЯЮ

Ученый секретарь, к.б.н.



Козлов Сергей Васильевич

7 декабря 2018 г.