

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального государственного
бюджетного учреждения «Государственный
научный центр «Институт иммунологии»
Федерального медико-биологического
агентства

д.м.н., проф., член-корр. РАН

Хайтов М.Р.

2019 года



ОТЗЫВ

о научно-практической значимости диссертационной работы

Барковской Маргариты Шамилевны

**«Длина теломер на отдельных плечах индивидуальных хромосом
и субпопуляционный состав Т-клеток памяти при бронхиальной астме»
на соискание ученой степени кандидата медицинских наук
по специальности «14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология»**

Актуальность темы

Диссертация Барковской М.Ш. «Длина теломер на отдельных плечах индивидуальных хромосом и субпопуляционный состав Т-клеток памяти при бронхиальной астме» на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности «14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология» посвящена актуальной проблеме. Бронхиальная астма (БА) является одним из наиболее распространенных заболеваний, связанных с воспалением дыхательных путей. Данное заболевание по меньшей мере приводит к ухудшению качества жизни, снижению работоспособности и в крайних случаях вызывает смерть. За последние годы распространение БА значительно расширилось. Заболеваемость в России составляет от 5,6 до 7% населения.

Для лечения БА применяют фармакотерапию (глюкокортикостероидными, антилейкотриеновыми препаратами и пр.), а также аллерговакцины. Однако ввиду значительной гетерогенности заболевания вышеуказанные способы лечения зачастую имеют ограниченную эффективность. В связи с этим поиск новых маркеров, которые позволят дифференцировать различные формы БА и реализовать персонализированный подход к ее лечению, является одной из актуальных задач современной биомедицины.

Тема диссертации полностью соответствует специальности «14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология».

Основные результаты

В результате проведённых исследований было разработано программное обеспечение для анализа длины теломер отдельных плеч хромосом на основе цифровых микрофотографий метафазных пластинок. В программном обеспечении автор предусмотрел процедуры выравнивания и нормирования флуоресцентного сигнала, а также вычитания фонового сигнала, что позволяет получать надежные экспериментальные данные.

Осуществлена модификация традиционной методики окраски теломер, что позволило улучшить качество дифференциального окрашивания метафазных хромосом, необходимое для получения более точных данных. После этого проведена валидация модифицированной методики и созданного программного обеспечения. Показано, что созданная программа обеспечивает надежную обработку показателей интенсивности флуоресценции и дает количественную оценку кластерам теломерных повторов на плечах хромосом.

Далее с использованием валидированных программы и методики автором проведены сравнительные исследования длины теломер у здоровых доноров и пациентов с БА. В результате исследования показано укорочение теломер, локализованных на 6p, 9p, 9q, 11q и 13q плечах индивидуальных хромосом, у пациентов с БА в сравнении с группой здоровых доноров. Средняя длина

теломер была снижена при длительном течении экзогенной астмы, но не эндогенной. Выявлено, что при эндогенной форме БА длина теломер не отличается от таковой у здоровых доноров. При этом в дебюте экзогенной БА происходит укорочение теломер лишь на плечах девятой хромосомы, тогда как при длительном течении экзогенной БА выявляется дополнительное укорочение семнадцати теломерных повторов. В совокупности эти данные свидетельствуют об укорочении теломер индивидуальных хромосом с развитием экзогенной формы БА.

Автором также были охарактеризованы субпопуляционный состав и пролиферативная активность Т-клеток памяти и наивных Т-лимфоцитов при БА. Показано, что накопление клеток памяти в популяции $CD4^+$ -Т-лимфоцитов периферической крови характерно для экзогенной формы БА. Также обнаружено увеличение субпопуляций $CD4^+$ - и $CD8^+$ -эффекторных Т-клеток памяти при экзогенной, но не эндогенной БА. Кроме того, выявлено повышенное содержание эффекторных клеток памяти среди популяции $CD4^+$ -Т-лимфоцитов периферической крови в дебюте экзогенной формы БА. Эти данные свидетельствуют о различиях в иммунопатогенезе эндогенного и экзогенного типов БА.

Дополнительно был проведен корреляционный анализ длины теломер индивидуальных хромосом и относительного количества Т-клеток памяти с возрастом, который свидетельствует о связи укорочения длины теломер с продолжительностью заболевания у пациентов с БА. Этот факт может указывать на ускоренное старение клеток иммунной системы в случае экзогенной БА.

Достоверность полученных результатов

Диссертационная работа выполнена на высоком научном и методическом уровне. Современные методы исследования, тщательный анализ экспериментальных данных, адекватно подобранные методы статистического

анализа убеждают в достоверности полученных результатов. Выводы обоснованы результатами исследований и четко сформулированы.

Научная новизна

Научная новизна диссертационной работы состоит в комплексном подходе к оценке длины теломер, пролиферативной активности и субпопуляционному составу Т-клеток памяти при основных клинко-патогенетических вариантах БА. В ходе работы впервые исследован теломерный профиль в Т-лимфоцитах периферической крови у пациентов с БА в сравнении с здоровыми донорами. При экзогенной форме БА, в отличие от эндогенной, показано значительно укорочение некоторых теломерных последовательностей на отдельных плечах хромосом. У пациентов в дебюте экзогенной БА выявлено укорочение теломер на обоих плечах хромосомы 9, тогда как при длительном течении заболевания укорочение теломер обнаружено на 19 плечах индивидуальных хромосом.

Также впервые исследованы изменения субпопуляционного состава Т-клеток памяти при эндогенной и экзогенной формах БА. Показано, что происходит накопление эффекторных клеток памяти в популяциях CD4⁺- и CD8⁺-Т-лимфоцитов периферической крови при экзогенной, но не эндогенной БА. В то же время относительное количество центральных Т-клеток памяти среди популяций CD4⁺- и CD8⁺-Т-лимфоцитов периферической крови было снижено у пациентов с обеими формами БА по сравнению со здоровыми индивидуумами.

Теоретическая значимость работы

Теоретическая значимость работы состоит в том, что выявлены особенности укорочения теломер на отдельных плечах индивидуальных хромосом при экзогенной форме БА, а также выявлена взаимосвязь между продолжительностью заболевания и длиной теломер. Полученные данные расширяют современные представления о различном характере

функционирования иммунной системы при экзогенной и эндогенной формах БА.

Научно-практическая значимость работы

Автором разработано специализированное программное обеспечение, которое позволяет анализировать микрофотографии метафазных хромосом и получать надежные количественные данные о длине теломер индивидуальных хромосом. Кроме того, модифицирована стандартная методика дифференциального окрашивания теломер, что позволило получать надежные количественные данные об их длине. Проведена валидация созданного программного обеспечения и продемонстрирована надежность и воспроизводимость получаемых экспериментальных данных. По результатам исследований автором получено свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ №2016614696.

С помощью созданного программного обеспечения исследована длина теломер хромосом у пациентов с эндогенной и экзогенной БА в сравнении с здоровыми донорами. Показано значительное укорочение теломер на отдельных плечах индивидуальных хромосом при экзогенной БА. Полученные новые знания не только расширяют представления о различном характере функционирования иммунной системы при экзогенной и эндогенной формах БА, но и могут быть использованы для реализации в медицинской практике персонализированного подхода к терапии различных форм БА. Выявленные автором закономерности укорочения теломер при развитии экзогенной БА могут также служить признаком индивидуальной предрасположенности к аллергическим заболеваниям.

Также стоит отметить, что разработанное программное обеспечение может быть использовано для изучения закономерностей изменения длины теломер при других патологических процессах (помимо БА), что будет

способствовать поиску надежных биомаркеров заболеваний, включая иммуноопосредованные заболевания.

Общая характеристика диссертационной работы

Диссертационная работа Барковской М.Ш. имеет классическую структуру и состоит из введения, литературного обзора, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 179 страницах, содержит 25 рисунков и 6 таблиц. Библиографический список включает 285 источников: 14 отечественных и 271 зарубежный.

Цель исследования сформулирована корректно и заключается в исследовании длины теломер на отдельных плечах индивидуальных хромосом и субпопуляционного состава и пролиферативной активности наивных Т-лимфоцитов и Т-клеток памяти при бронхиальной астме.

Обзор литературы написан логично, полностью соответствует теме диссертации и обосновывает необходимость проведения настоящего исследования.

Раздел «Материалы и методы» содержит подробное описание методов, использованных в исследовании. Обращает на себя внимание современный уровень использованных молекулярно-биологических и иммунологических методов, а также тщательный подход к выбору условий методики Q-FISH для дифференциального окрашивания хромосом.

В разделе «Результаты» описываются результаты собственных исследований. В частности, описана разработка программного обеспечения для анализа теломер, валидация этой программы, а также приведено описание экспериментов по изучению длины теломерных участков при БА.

В разделе «Обсуждение» автором проведен тщательный сравнительный анализ собственных данных и результатов, опубликованных в мировой

научной литературе, что дает основание для формирования полноценных выводов.

В «Заключении» автор кратко и емко обобщает полученные результаты.

Сформулированные выводы логичны и целиком вытекают из результатов исследования.

Автором опубликовано 12 работ, в том числе 3 статьи в научных журналах, которые включены в перечень рецензируемых периодических научных изданий, рекомендованных для опубликования основных научных результатов докторских и кандидатских диссертаций.

Автореферат полностью отражает содержание диссертационной работы.

Заключение

Диссертационная работа Барковской М.Ш. «Длина теломер на отдельных плечах индивидуальных хромосом и субпопуляционный состав Т-клеток памяти при бронхиальной астме» на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности «14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология» является научно-квалификационной работой, в которой осуществлено решение актуальных задач, имеющих существенное значение для клинической иммунологии и аллергологии: оптимизирована методика дифференциального окрашивания теломер, создано и валидировано новое программное обеспечение, позволяющее получать надежные данные о изменении их размера, а также изучен характер укорочения теломер на отдельных плечах индивидуальных хромосом и содержание различных субпопуляций Т-клеток памяти и наивных Т-лимфоцитов в периферической крови пациентов с бронхиальной астмой, что отражает иммунопатогенетические различия между различными формами бронхиальной астмы.

Диссертационная работа полностью соответствует требованиям, предъявленным к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, (п.9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного

постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями №335 от 21.04.2016г., №748 от 02.08.2016 г.), а ее автор заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата медицинских наук по специальности «14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология».

Отзыв обсужден и утвержден на заседании лаборатории противовирусного иммунитета ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России (протокол № 7 от 11 ноября 2019 г.).

Заведующий лабораторией
противовирусного иммунитета
ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии»
ФМБА России
д.б.н.

Шиловский Игорь Петрович

11.11.2019 г.

Контактная информация:

115522, Россия, Москва, Каширское шоссе, д. 24.

ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России

E-mail: info@nrcii.ru

Телефон +7 (499) 311-67-78

