

О Т З Ы В

официального оппонента доктора медицинских наук Повещенко Ольги Владимировны на диссертационную работу Шевырева Даниила Вадимовича «ВЛИЯНИЕ ГУМОРАЛЬНЫХ ФАКТОРОВ ГОМЕОСТАТИЧЕСКОЙ ПРОЛИФЕРАЦИИ НА Т-РЕГУЛЯТОРНЫЕ КЛЕТКИ В НОРМЕ И ПРИ РЕВМАТОИДНОМ АРТРИТЕ IN VITRO» представленную на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.09 – «Клиническая иммунология, аллергология»

Актуальность темы

Актуальность исследования не вызывает сомнения и обусловлена тем, что ревматоидный артрит (РА) является одним из наиболее распространенных аутоиммунных заболеваний человека, и, несмотря на всю проводимую терапию, приводит к инвалидизации, потере трудоспособности.

В основе патогенеза РА лежит нарушение баланса между регуляторными и эффекторными звеньями иммунитета. Основными клетками, которые регулируют иммунный ответ на различные антигенные стимулы, а также обеспечивают толерантность к собственным антигенам, являются Т-регуляторные лимфоциты (Treg), функциональная активность которых снижена при РА. С другой стороны, воздействие внешних негативных факторов на организм человека, приводящих к развитию лимфопении, запускает механизм гомеостатической пролиферации (ГП) для численного восстановления пула Т-лимфоцитов. Основными факторами, обеспечивающими ГП, являются контакт Т-клеточного рецептора (TCR) с аутоантигеном в составе главного комплекса гистосовместимости (МНС) и взаимодействие с цитокинами IL-7 и IL-15.

В этом аспекте диссертационная работа Шевырева Даниила Вадимовича посвящена важным вопросам, которые позволяют понять, каким образом данные гомеостатические факторы влияют на фенотип и функциональную активность Treg пациентов с РА и здоровых доноров и, могут ли они участвовать в восстановлении пула Treg после лимфопении.

Соответствие темы диссертации научной специальности

Тема диссертационной работы Шевырева Д.В. соответствует заявленной специальности 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология (согласно паспорту ВАК научной специальности: «посвящена изучению иммунитета и его нарушений, а также созданию методов диагностики, профилактики и лечения заболеваний, связанных с нарушениями в системе иммунитета).

Новизна исследования, полученных результатов и выводов, сформулированных в диссертации

Все результаты исследования являются новыми, впервые полученными автором и опубликованными в научных журналах высокого уровня.

В частности, автором впервые установлено, что гуморальные факторы ГП – IL-7 и IL-15 способны индуцировать экспрессию молекулы PD-L1 на Treg как у доноров, так и у пациентов с РА, стимуляция анти-CD3-антителами в комбинации с IL-2 увеличивает не только экспрессию молекул PD-L1 и CTLA-4, но и содержание Treg, экспрессирующих PD-L1, CTLA-4, HLA-DR и CCR4.

Впервые изучено влияние гуморальных факторов ГП на супрессорную активность Treg. Установлено, что Treg способны эффективно подавлять пролиферацию CD4⁺ и CD8⁺ -клеток, вызванную IL-7 и IL-15. В то же время способность Treg подавлять пролиферацию CD4⁺ и CD8⁺ -лимфоцитов резко снижается в условиях, когда влияние цитокинов ГП – IL-7 или IL-15 (но не IL-2) сопровождается сильной стимуляцией TCR анти-CD3-антителами. Новизну исследования составляют данные о том, что предварительная обработка Treg IL-7 снижает супрессорную активность Treg при стимуляции анти-CD3-антителами. Впервые проведено сравнение супрессорной активности Treg условноздоровых доноров и пациентов с РА в условиях стимуляции гуморальными факторами ГП. При этом во всех условиях стимуляции (анти-CD3, анти-CD3+IL-2, анти-CD3+IL-7, анти-CD3+IL-15, IL-7, IL-15, анти-CD3+Treg(IL-7)) разницы между донорами и пациентами с РА не наблюдалось.

Таким образом, все результаты исследования оригинальны и интересны для научного сообщества.

Научно-практическая значимость

Научная значимость исследования несомненна, поскольку затрагивает малоизученное супрессорное свойство Т-регуляторных клеток при РА. Выявленные особенности влияния гуморальных факторов ГП на супрессорную активность Treg позволяют расширить современные представления о негативном влиянии ГП на иммунное равновесие и раскрывают дополнительный механизм, который может способствовать нарушению аутоотолерантности в условиях лимфопении и увеличивать риск развития аутоиммунных заболеваний. Выявленная строгая корреляционная связь между активностью заболевания и содержанием переходных форм FoxP3⁺RORγt⁺ и CD4⁺RORγt⁺ лимфоцитов может в перспективе позволить использовать маркер RORγt, как дополнительный параметр при оценке активности РА.

Результаты диссертации открывают новые направления научных исследований специфических клонов Т-лимфоцитов, которые участвуют в нарушении толерантности, что позволит в перспективе использовать индивидуальные подходы к терапии пациентов с РА, основанные на специфическом воздействии на эти клоны с помощью моноклональных антител или CAR-T-лимфоцитов.

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

Диссертация Шевырева Д.В. выполнена на высоком научном и методическом уровне. Выборка доноров и пациентов соответствует поставленной цели и задачам исследования и достаточна по объему для формирования обоснованных выводов. Сформулированные автором цель исследования и алгоритм поставленных задач последователен и логичен, и соответствуют теме исследования. Все исследования проведены на сертифицированном и откалиброванном оборудовании. Результаты обработаны с помощью адекватных статистических методов и достоверны. Выводы диссертации не в полной мере соответствуют поставленным задачам, не совсем четко сформулированы. Достоверность полученных данных также подтверждена опубликованными 10 печатными работами в журналах, рекомендованных ВАК РФ, а также индексируемых в базах Scopus и Web of Science.

Оценка содержания и завершенности диссертации

Работа написана в традиционном стиле и включает в себя введение, обзор данных литературы, главу «Материалы и методы», результаты собственных исследований, обсуждение, заключение и выводы. Диссертация изложена на 127 страницах машинописного текста, хорошо иллюстрирована. Цитируется 274 литературных источника.

Введение очень подробно обосновывает актуальность и освещает степень разработанности темы исследования, представлены цель и задачи исследования, научная новизна, теоретическая и практическая значимость исследования, положения, выносимые на защиту.

Литературный обзор производит хорошее впечатление, свидетельствует об эрудиции автора. Материал изложен логично и последовательно, наглядно иллюстрирован схемами. В конце автор делает заключение, которое резюмирует круг проблем относительно влияния гомеостатических факторов на Treg при РА и формирует на этой основе оригинальное направление собственных исследований.

В главе «Материалы и методы» подробно и обстоятельно описаны все экспериментальные процедуры, задействованные в процессе выполнения диссертационной работы. Представлен дизайн исследования. Методики описаны весьма подробно, что не оставляет сомнений в возможности их воспроизведения. Исследование проведено на достаточном объеме материала. Обращает на себя внимание тщательная статистическая обработка результатов исследования.

Глава 3 посвящена результатам собственных исследований. Порядок изложения построен таким образом, что описание полученных результатов во всех главах сопровождается их анализом, после чего следует резюме и логический переход к последующим исследованиям.

В первом разделе 3 главы автор характеризует Т-регуляторные клетки периферической крови при ревматоидном артрите, сравнивая параметры между

группами доноров и пациентов. Для подробного сравнения содержания Treg автор изучает процентное содержание субпопуляций, отличающихся уровнем экспрессии молекулы CD25, что может отражать не только функциональную активность Treg, но возможность трансдифференцировки. Несомненно достоинством диссертации является исследование фенотипических характеристик Treg в культурах на предварительно окрашенных с помощью CFSE клетках, что позволило автору исключить стимуляционные фенотипические изменения, которые могут негативно повлиять на качество цитометрического анализа. Также по экспрессии ряда маркеров оценивается супрессорный и миграционный потенциал, возможность взаимодействия с АПК, ядерный транскрипционный фактор и исследуются корреляционные связи ряда показателей с тяжестью течения РА. Выявленные Шевыревым Д.В. особенности популяции Treg у пациентов и ассоциированность с активностью заболевания отражают негативные изменения со стороны T-регуляторного звена, которые могут участвовать в самоподдержании воспалительного процесса при РА. Опираясь на полученные данные, автор исследует супрессорную активность Treg *in vitro*

Во втором разделе 3 главы исследуется влияние гуморальных факторов ГП – IL-7 и IL-15 на Treg *in vitro* при различных условиях культивирования у доноров и пациентов с РА. Автором показано, что цитокины ГП способны не только поддерживать экспрессию FoxP3 в Treg, сохраняя их фенотип, но также обеспечивать восполнение их пула путём пролиферации. Для определения супрессорного потенциала Treg автор использует комплексный подход – 1) исследует экспрессию различных функциональных молекул, 2) концентрацию супрессорных цитокинов IL-10 и TGF- β при культивировании МНК с Treg, 3) способность подавлять пролиферацию CD4 + и CD8 + лимфоцитов *in vitro*. Автор заключает, что стимуляция anti-CD3+IL-2 Treg пациентов с РА способствует продукции противовоспалительных цитокинов и большей экспрессией CCR4, что может говорить об активированном статусе Treg при РА и более высокой, чем у доноров супрессорной активности этих клеток.

Логичному завершению проведенного исследования является решение вопроса о прямой супрессорной активности Treg по оценке подавления пролиферации эффекторных CD4 + и CD8 + клеток *in vitro*, как в классических условиях активации пролиферации при стимуляции anti-CD3-антителами и IL-2, так и под влиянием IL-7 и IL-15, как основных гуморальных факторов ГП, чему посвящен **третий раздел 3 главы**. Автором показано, что способность Treg подавлять пролиферацию CD4+ и CD8+ -лимфоцитов, индуцированную IL-7 или IL-15, резко снижается в условиях стимуляции TCR, обусловленной анти-CD3-антителами как в группе доноров, так и у пациентов с РА.

В конце главы результатов исследования Шевырев Д.В. делает краткое резюме полученных результатов.

Глава «Обсуждение» написана заинтересованно, посвящена сравнению собственных результатов исследования с данными других авторов, проводится

аргументированное объяснение полученных результатов в соответствии с имеющимися на сегодняшний день представлениями.

Итоги работы подведены в разделе «**Заключение**».

Полученные автором результаты очень четко и обоснованно дают ответы на поставленные цель и задачи. Однако результаты не в полной мере отражены в выводах и не представлены ответами на вопросы, поставленные целью и задачами исследования. Этот раздел автору необходимо доработать.

Автореферат в целом отражает содержание диссертации.

В целом диссертация Шевырева Д.В. производит очень хорошее впечатление, она современна, высокотехнологична, конкретна, обладает внутренним единством, написана заинтересованно, хорошим литературным языком. Работа хорошо иллюстрирована, встречаются единичные опечатки, но они не умаляют достоинств работы. Принципиальных замечаний к работе нет.

Вопросы к автору носят дискуссионный характер:

1. Насколько пластичность Treg/Th17 может возникать в зонах воспаления сустава и какими факторами это обуславливается? Могут ли Treg дифференцироваться *in vivo* в Т-клетки памяти?
2. Почему, несмотря на инфильтрацию Treg синовиальных тканей, не происходит разрешения воспалительного процесса.
3. Насколько антигенная специфичность TCR определяет тип иммунного ответа, в регуляции которого участвуют Treg?
4. Какие существуют подходы для усиления активности Treg? Может ли клеточная терапия Treg после их экспансии *in vitro* служить подходом лечения РА?

Материалы диссертации могут использоваться в программах преподавания иммунологии в медицинских и биологических ВУЗах, а также могут быть включены в программы клинической ординатуры и аспирантуры. Результаты диссертационной работы могут быть применены при разработке новых методов оценки эффективности болезнь-модифицирующей терапии.

Заключение

Диссертационная работа Шевырева Даниила Вадимовича «ВЛИЯНИЕ ГУМОРАЛЬНЫХ ФАКТОРОВ ГОМЕОСТАТИЧЕСКОЙ ПРОЛИФЕРАЦИИ НА Т-РЕГУЛЯТОРНЫЕ КЛЕТКИ В НОРМЕ И ПРИ РЕВМАТОИДНОМ АРТРИТЕ *IN VITRO*» является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение научной задачи, имеющей существенное значение для клинической иммунологии, аллергологии, ревматологии – гуморальные факторы гомеостатической пролиферации IL-7 и IL-15 являются модуляторами супрессорной активности Treg у пациентов с РА.

По актуальности избранной темы, поставленным задачам, новизне и значимости полученных результатов, обоснованности научных выводов диссертационная работа Шевырева Д.В. соответствует требованиям ВАК РФ к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук в п.9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 (в редакции постановления Правительства Российской Федерации от 21.04.2016 г. № 335, от 02.08.2016 г. № 748, от 29.05.2017 г. №650, от 28.08.2017 г. № 1024, от 01.10.2018 г. № 1168). Автор Шевырев Д.В. достоин присуждения ему ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология.

Официальный оппонент:

Заведующая лабораторией
клеточных технологий НИИКЭЛ филиал
ФИЦ ИЦИГ СО РАН
доктор медицинских наук
630117, Россия, г. Новосибирск,
ул. Тимакова, 2,
тел. (383) 333-64-09,
<http://niikelsoramn.ru/>
E-mail: lymphology@niikel.ru
Доктор медицинских наук по специальности
03.03.04 - Клеточная биология, цитология,
Гистология (медицинские науки)



Повещенко Ольга Владимировна

20.10.2020 г.

Подпись д.м.н. Повещенко О.В. заверяю

И.о. ученого секретаря
НИИКЭЛ – филиал ИЦИГ СО РАН



Власова Наталья Васильевна