

## Отзыв

официального оппонента доктора медицинских наук Топтыгиной Анны Павловны на диссертационную работу Шевырева Даниила Вадимовича «Влияние гуморальных факторов гомеостатической пролиферации на Т-регуляторные клетки в норме и при ревматоидном артрите *in vitro*», представленной на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.09 - клиническая иммунология, аллергология.

### Актуальность избранной темы

В XX в фармацевтическая отрасль переживала бурный рост, были созданы новые классы препаратов, например антибиотики, которые коренным образом изменили терапевтические подходы и прогнозы для многих тяжелых заболеваний. Казалось, еще немного, и мы справимся и с инфекционными, и с многими другими болезнями, однако оказалось, что микроорганизмы вырабатывают устойчивость к препаратам, а новых антибиотиков создается не так много. Одним из перспективных направлений на современном этапе является разработка препаратов, способных оказывать регуляторное воздействие на собственную иммунную систему. Действительно, при некоторых заболеваниях, особенно хронических инфекциях и опухолях, необходимо стимулировать иммунитет, а при других, как показало тяжелое течение Covid-19, или при аутоиммунной патологии, например при ревматоидном артрите (РА), необходимо наоборот притормозить слишком активный иммунный ответ. Регуляцией иммунного ответа занимаются специальные субпопуляции Т-лимфоцитов, называемые Т-регуляторные клетки (Treg). Такая регуляция вовлекает разные механизмы. Это может быть контактное взаимодействие, для чего существуют специальные ко-стимулирующие и ко-ингибирующие молекулы, это может быть цитокиновая регуляция, и для этого есть специальные цитокины, возможно использование цитотоксических механизмов и за счет взаимодействия Fas-FasL, и за счет вовлечения цитотоксических гранул.

Популяция Treg состоит, по крайней мере, из 2-х субпопуляций: натуральных Treg, образующихся в тимусе и занимающихся контролем аутореактивности, и индуцированных Treg, образующихся на периферии из  $CD4^+$  лимфоцитов и занимающихся контролем толерантности к антигенам пищи и плода при беременности, а также эти клетки ограничивают иммунные ответы, протекающие в организме. Обе субпопуляции экспрессируют FoxP3, но различаются по спектру и интенсивности экспрессии других молекул.

Многие заболевания и неблагоприятные факторы окружающей среды приводят к более или менее выраженной лимфопении из-за потери или гибели лимфоцитов. В организме существуют специальные механизмы восполнения таких потерь, однако такой механизм, как гомеостатическая пролиферация, сопряжен и с определенными рисками. В связи с вышеизложенным, диссертационная работа, направленная на изучение гомеостаза и регуляции функциональной активности Treg в норме и при аутоиммунной патологии, несомненно, является весьма актуальным и своевременным исследованием.

### **Научная новизна исследования и полученных результатов**

Научная новизна диссертационной работы Шевырева Д.В. заключается в первую очередь в изучении влияния гомеостатических цитокинов IL-7 и IL-15 на экспрессию регуляторных молекул и супрессорную активность Treg. Впервые установлено, что IL-7 и IL-15 повышают плотность экспрессии PD-1L на Treg здоровых и больных РА. Автором показано, что Treg подавляют пролиферацию  $CD4^+$  и  $CD8^+$  -клеток, вызванную IL-7 и IL-15, и супрессорная активность Treg снижается при условии одновременного с цитокинами воздействия анти-CD3-антителами.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Теоретическая значимость работы заключается в получении новых знаний о механизмах регуляторных воздействий Treg на пролиферацию  $CD4^+$  и  $CD8^+$  лимфоцитов, вызванную гомеостатическими цитокинами IL-7

и IL-15. Тот факт, что одновременная стимуляция IL-7 и IL-15 и анти-CD3-антителами снижает супрессорную активность Treg, объясняет, почему Treg не блокируют гомеостатическую пролиферацию лимфоцитов в случае лимфопении, тогда как присутствие IL-2 сохраняет супрессорную активность Treg, что позволяет им выполнять свои надзорные функции.

Кроме того, диссертация имеет важное практическое значение. Так были выявлены различия в экспрессии иммунорегуляторных рецепторов Treg у больных РА по сравнению со здоровой группой. В то же время, не было выявлено нарушений в активности Treg у больных по сравнению со здоровыми. Предложено использовать маркер ROR $\gamma$ t как дополнительный параметр при оценке активности РА.

#### **Достоверность полученных результатов и обоснованность научных положений и выводов**

Достоверность результатов, обоснованность научных положений и выводов не вызывает сомнений. Это обеспечено использованием адекватных методов, достаточным количеством исследованных пациентов и здоровых доноров. Диссертационная работа выполнена на высоком научном и методическом уровне с использованием культуральных, иммунофлюоресцентных, иммуноферментных методов исследования на сертифицированном оборудовании. Для статистической обработки полученных данных были использованы общепринятые методы статистики, позволяющие оценить достоверность выявленных изменений.

Основные положения и выводы, сформулированные автором, являются логически обоснованными, полученные данные сопоставлены с результатами других исследователей.

Результаты диссертационной работы Шевырева Д.В. полно представлены в 10 печатных работах, в том числе 3 из них в периодических рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для опубликования

основных научных результатов диссертационных работ и 2 статьи в журналах, индексируемых в базах Scopus и Web of Science.

Автореферат полно отражает содержание диссертации. В нем изложены цель, задачи и актуальность исследования, основные положения, выносимые на защиту, научная новизна и научно-практическая значимость работы, изложены наиболее значимые результаты работы и выводы.

### **Общая характеристика диссертационной работы**

Диссертационная работа Шевырева Д.В. построена по общепринятому плану и содержит введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, полученных результатов, их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 127 страницах и проиллюстрирована 36 рисунками. Список литературы включает 274 источника.

Во введении автор обосновывает актуальность исследования, излагает цель и задачи, описывает новизну и практическую значимость работы, представляет положения, выносимые на защиту.

В обзоре литературы описаны иммунологические механизмы и роль регуляторных Т-клеток в патогенезе ревматоидного артрита, особенности гомеостаза Т-клеток и роль гомеостатической пролиферации в патогенезе аутоиммунных заболеваний, субпопуляционный состав, функции и гомеостаз регуляторных Т-клеток. К сожалению, в обзоре представлены только англоязычные авторы, хотя среди отечественных работ достаточное количество посвящено исследованию Treg.

В главе «материалы и методы» представлена методическая часть работы: описаны исследованные группы пациентов, критерии включения/исключения, представлена схема экспериментов. Описаны использованные методы: культуральные, иммунофлюоресцентные, иммуноферментные и методы статистического анализа.

В главе «результаты собственных исследований» представлены 3 группы

исследований. В первом разделе изучены различные маркеры Treg и субпопуляции этих клеток у здоровых доноров в сравнении с больными РА. Показано, что у больных РА значимо снижена субпопуляция Treg, CD25<sup>hi</sup>FoxP3<sup>+</sup> и повышена CD25<sup>lo</sup>FoxP3<sup>+</sup>. Также показано, что у больных РА не только повышено содержание Th17 в периферической крови, что вполне обосновано, поскольку эти клетки играют важную роль в данном заболевании, но и количество переходных клеток, ко-экспрессирующих FoxP3 и RORγt. Выявлено снижение экспрессии CTLA-4 и повышение экспрессии CCR4 на Treg пациентов. Следует отметить, что CTLA-4 экспрессируется не только на Treg, но и на активированных Т-лимфоцитах, а ко-экспрессия CTLA-4 и CCR4 также отмечается на активированных Т-эффекторах, а не только на индуцированных Treg. Во втором разделе исследовано влияние IL-2, IL-7 и IL-15 на Treg *in vitro*. Обнаружено, что при длительном культивировании выделенных моноклеаров *in vitro* происходит снижение экспрессии CD25 на Treg, а добавление IL-2, IL-7 или IL-15 в культуру клеток нивелирует это снижение. Показано, что IL-7 IL-15 обладают более слабым пролиферативным действием на Treg по сравнению с IL-2, а у пациентов с РА это воздействие оказалось еще меньшим, чем у здоровых. Это может быть связано с тем, что у здоровых и больных РА разное соотношение индуцированных и натуральных Treg. Показано, что IL-2 хорошо стимулирует экспрессию регуляторных молекул на Treg, тогда как IL-7 и IL-15 почти не влияют на этот процесс. В третьем разделе представлены результаты изучения IL-2, IL-7 и IL-15 на супрессорную активность Treg. Наибольшим воздействием отличался IL-7. Не было выявлено различий ни между здоровыми и больными, ни в зависимости от активности, ни от давности заболевания. Добавление анти-CD3-антител снижало супрессорную активность Treg. Следует отметить, что у обследованных доноров и пациентов не было признаков лимфопении. Условия лимфопении создавались искусственно в тестах *in vitro*, в соответствии с

представлениями автора о факторах, важных при лимфопении. Однако наши знания на этот счет нельзя признать абсолютно верными. Более того, известно, что для выполнения функции гомеостатической поддержки Т-лимфоцитов необходим тесный контакт (синапс) между Т-лимфоцитом и мембрансвязанной формой цитокина на поверхности другой клетки (для IL-7 это ретикулярные фибробласты, а для IL-15 – эпителиальные клетки или активированные макрофаги). Вероятно, в этом синапсе принимают участие и другие рецепторы. Поэтому полученные *in vitro* результаты при добавлении свободных цитокинов некорректно экстраполировать на события, развивающиеся при лимфопении *in vivo*. Все результаты собственных исследований представлены только в виде графиков. В диссертации нет ни одной таблицы, а абсолютные значения в тексте не приводятся, что затрудняет анализ полученных автором результатов.

Описание каждой группы экспериментов перемежается с обсуждением полученных результатов и сопоставлением их с литературными данными, что затрудняет восприятие собственных достижений автора. Более того, для обсуждения результатов в диссертации выделена отдельная глава, и было бы логичнее перенести все обсуждения в эту главу. Обсуждение диссертационной работы содержит краткое резюме, охватывающее основные моменты проведенных исследований. Выводы обоснованы, логически вытекают из полученных диссертантом в ходе работы результатов, и полностью соответствуют поставленным задачам.

#### Замечания:

Для того чтобы исследовать влияние IL-15 на Treg нужно изучить экспрессию рецепторов к этому цитокину. Известно, что на лимфоцитах этот рецептор представлен в виде гетеродимера CD122 и CD132, но нужна также и  $\alpha$ -субъединица, экспрессирующаяся на эпителиальных клетках и активированных макрофагах. Рецептор CD122/CD132 не связывается со свободным IL-15, а только со связанным в комплексе IL-15/IL-15R $\alpha$ . Такой комплекс может длительно сохраняться на мембране, независимо от

присутствия IL-15 в растворе, однако такое исследование проведено не было. При выделении моноклеаров в полученной клеточной популяции присутствуют моноциты, которые могут экспрессировать  $\alpha$ -субединицу IL-15R, но при магнитной сепарации эти клетки могли быть потеряны, поэтому действие IL-15 могло быть слабо выражено. Более того, субъединицы CD122 и CD132 входят в состав рецептора для IL-2, который и является гомеостатическим цитокином для Treg.

Субпопуляция Treg характеризуется экспрессией CD127 low-neg. Если клетки, несущие CD127<sup>low</sup> могут связываться с IL-7, то субпопуляция CD127<sup>neg</sup> в принципе не может отвечать на IL-7, эта субпопуляция выпала из изучения. В составе Treg присутствует 2 субпопуляции: натуральные Treg, отвечающие за контроль аутореактивности, и индуцированные Treg, отвечающие за контроль иммунных ответов, толерантность к антигенам пищи и плода. Эти субпопуляции играют разную роль в патогенезе ревматоидного артрита и их детальное исследование, вероятно, могло бы выявить различия в экспрессии рецепторов и ответе на IL-7 и IL-15.

Такие исследования могли бы составить тему для дальнейшей разработки изучаемой области. Вышеизложенные замечания носят уточняющий, рекомендательный характер и не снижают ценности диссертационной работы.

### **Заключение**

Диссертация Шевырева Даниила Вадимовича «Влияние гуморальных факторов гомеостатической пролиферации на Т-регуляторные клетки в норме и при ревматоидном артрите *in vitro*», представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.09 - клиническая иммунология, аллергология, является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение научной задачи, имеющей значение для развития медицинской отрасли знаний: изучение

влияния цитокинов IL-2, IL-7 и IL-15 на фенотипические характеристики и функциональную активность Treg *in vitro* у здоровых людей и пациентов с РА.

Диссертационная работа Шевырева Даниила Вадимовича «Влияние гуморальных факторов гомеостатической пролиферации на Т-регуляторные клетки в норме и при ревматоидном артрите *in vitro*» соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, (п. 9 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 г. с изменениями в редакции постановлений Правительства Российской Федерации № 335 от 21.04.2016 г., № 748 от 02.08.2016 г., № 650 от 29.05.2017 г., № 1024 от 28.08.2017 г., № 1168 от 01.10.2018 г.), а ее автор, заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.09 - клиническая иммунология, аллергология.

**Официальный оппонент:**

Руководитель лаборатории цитокинов  
Федерального бюджетного учреждения  
науки «Московский научно-  
исследовательский институт эпидемиологии  
и микробиологии им. Г.Н. Габричевского»  
Федеральной службы по надзору в сфере  
защиты прав потребителей и благополучия  
человека, доктор медицинских наук



Топтыгина Анна Павловна

125212, Москва, ул. Адм. Макарова д.10

тел: 8(495)452-18-01, e-mail toptyginaanna@rambler.ru

09.11.2020

Подпись А.П. Топтыгиной заверяю

Ученый секретарь

ФБУН МНИИОМ им. Г.Н.Габричевского

Роспотребнадзора, к.м.н.



Сафронова Алла Васильевна