

## **ОТЗЫВ**

официального оппонента доктора медицинских наук, профессора

Савченко Андрея Анатольевича

на диссертацию Сметаненко Екатерины Александровны

**«Плацентарный фактор роста в регуляции Т-клеточных функций и экспрессии ингибиторных рецепторов»**, представленную на соискание

ученой степени кандидата медицинских наук по специальности

3.2.7 – Аллергология и иммунология

### **Актуальность темы**

Иммуномодулирующая активность ангиогенных факторов привлекает большое внимание, поскольку формирования новых сосудов сопровождается выраженными изменениями в иммунной системе. Наиболее ярко это продемонстрировано при опухолевом росте в отношении фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), который подавляет иммунный ответ, являясь одним из ключевых факторов опухоль-индуцированной иммуносупрессии. Неоангиогенез является также неотъемлемым атрибутом гестации, при которой успешное вынашивание плода требует перестройки иммунной системы. Причем при беременности отмечается выраженное возрастание другого фактора семейства VEGF – фактора роста плаценты (PlGF). Иммуномодулирующие свойства этого фактора, особенно в отношении Т-лимфоцитов, практически не исследованы. Однако тот факт, что снижение PlGF является предиктором гестационного осложнения (преэклампсии), связанного с активацией иммунной системы, позволяет предполагать важную роль PlGF в иммунной перестройке при беременности. Следует отметить, что в отличие от VEGF, который регулирует функции Т-клеток через связывание с рецептором к VEGF 2-го типа, PlGF взаимодействует только с рецептором к VEGF 1-го типа. Потому исследование влияния PlGF на Т-клетки создает уникальную возможность для изучения роли сигналинга через рецептор 1-го типа в регуляции Т-лимфоцитов. Таким образом, актуальность диссертационной работы Сметаненко Екатерины Александровны как фундаментальном, так и практическом аспектах не вызывает сомнений.

### **Научная новизна исследования**

Научная новизна работы Е.А. Сметаненко заключается прежде всего в том, что автором впервые продемонстрирован прямой ингибирующий эффект PlGF на пролиферацию Т-лимфоцитов *in vitro*. Установлено, что супрессии подвержены обе популяции Т-клеток (CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клетки). Выявленный

эффект фактора реализуется через связывание с рецептором к VEGF 1-го типа. Также показано, что PlGF повышает способность  $CD4^+$  и  $CD8^+$  Т-лимфоцитов продуцировать IL-10, усиливает активационно-индуцированный апоптоз  $CD8^+$  Т-лимфоцитов и повышает экспрессию Т-клетками ингибиторных рецепторов (PD-1, CTLA-4 и Tim-3) с наиболее выраженным эффектом в отношении Tim-3. Получены новые данные о закономерностях экспрессии ингибиторных рецепторов на периферических Т-клетках беременных с высоким (неосложненная гестация) и низким (преэклампсия) уровнем PlGF. Автором впервые показано возрастание Т-клеток, экспрессирующих и коэкспрессирующих молекулы PD-1 и Tim-3 при неосложненной гестации в сравнении с фертильными небеременными. При этом установлено, что увеличение экспрессии PD-1 и Tim-3 не является следствием сопутствующей экстрагенитальной патологии, поскольку наблюдается как у женщин с наличием, так и отсутствием коморбидного статуса. Тем не менее, сопутствующая коморбидная патология, а также срок гестации и паритет родов ассоциированы с определенными особенностями в экспрессии ингибиторных рецепторов. По сравнению с неосложненной гестацией беременные с преэклампсией отличаются сниженной экспрессией PD-1 и Tim-3 на Т-клетках в совокупности с возрастанием экспрессии CTLA-4 в популяции  $CD4^+$ -лимфоцитов. При этом автором впервые продемонстрирована сопряженность между экспрессией ингибиторных рецепторов и тяжестью, а также сроками манифестации преэклампсии.

### **Теоретическая и научно-практическая значимость исследований**

Теоретическая значимость работы заключается в расширении представлений об иммуномодулирующей активности PlGF, в частности, выявлении способности фактора регулировать *in vitro* функции Т-клеток. Анализ закономерностей экспрессии VEGFR-1 Т-клетками и серия экспериментов с блокированием рецепторов к VEGF 1-го и 2-го типа свидетельствуют о функциональности VEGFR-1 на Т-клетках и участии этого рецептора в регуляции функций Т-лимфоцитов. При этом данные о влиянии PlGF на экспрессию Т-клетками ингибиторных рецепторов углубляет знания о молекулярных механизмах иммуносупрессии, опосредованной ангиогенными факторами. Выявление различий в экспрессии Tim-3, PD-1 и CTLA-4 на циркулирующих Т-клетках у беременных с высоким и сниженным уровнем PlGF является аргументом в пользу реализации иммуномодулирующей активности фактора *in vivo*. Выявленные изменения в экспрессии ингибиторных рецепторов при неосложненной гестации у



беременных с сопутствующими экстрагенитальными заболеваниями подчеркивает важность коморбидного статуса как фактора, способного влиять на адаптацию иммунной системы. В свою очередь, продемонстрированные особенности в экспрессии ингибиторных рецепторов в зависимости от сроков манифестации ПЭ являются еще одним аргументом в пользу иммунопатогенетической разнородности ранней и поздней ПЭ.

Практическая значимость работы заключается в установлении факторов, ассоциированных с особенностями экспрессии ингибиторных рецепторов на периферических Т-клетках беременных во второй половине гестации. В частности, сопряженность сопутствующей экстрагенитальной патологии с достоверными изменениями в экспрессии Tim-3 и PD-1 указывает на важность учета коморбидного статуса с точки зрения эффективности иммунной перестройки. Кроме того, полученные данные об экспрессии PD-1, CTLA-4- и Tim-3 периферическими Т-клетками у беременных с неосложненной гестацией и преэклампсией являются основанием для изучения прогностической значимости указанных параметров в качестве новых биомаркеров иммунной адаптации и предикторов развития гестационных осложнений.

### **Достоверность и обоснованность научных положений и выводов, сформулированных в диссертации**

Проведенные исследования полностью соответствуют поставленной цели и задачам диссертации и выполнены в полном объеме. Достаточная выборка пациентов, продуманный дизайн, включающий исследования *in vitro* и проспективное когортное обсервационное исследование, тщательный отбор пациентов с учетом критериев включения и исключения, использованием современных иммунологических методов (многоцветная проточная цитофлюориметрия) и соответствующая поставленным задачам статистическая обработка свидетельствуют о достоверности и обоснованности полученных результатов. Все положения, выносимые на защиту, подтверждены полученными результатами. Выводы подтверждены фактическим материалом и отражают суть проведенных исследований. Следует отметить личное выполнение автором всех этапов клинической части работы (отбор пациентов, оценка клинической картины, разработка и заполнение регистрационных карт). Научные положения и выводы, сформулированные в диссертации, неоднократно представлены и обсуждены на научных конференциях. Основные результаты исследований опубликованы в 9 научных работах, включая 5 статей в журналах, рекомендованных ВАК

РФ для публикации материалов диссертационных работ, в том числе одна статья в журнале, индексируемом в базе WoS (Q1).

### **Оценка содержания и завершенности диссертации**

Диссертация написана в традиционном стиле и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов собственных исследований, обсуждения полученных результатов, заключения и выводов. Материал изложен на 128 страницах машинописного текста, иллюстрирован 22 таблицами и 9 рисунками. Библиографический указатель включает 212 источников.

Во введении автор представляет обоснование актуальности избранной темы и степень ее разработанности, четко формулирует цель и задачи исследования, формулирует научную новизну, теоретическую и практическую значимость работы и основные положения, выносимые на защиту.

В литературном обзоре автор знакомит с современными представлениями о перестройке иммунной системы при беременности и концентрирует внимание на механизмах, регулирующих функции Т-клеток. Отдельная глава посвящена чек-поинт молекулам, в частности ингибиторным рецепторам PD-1, CTLA-4 и Tim-3, их роли в регуляции функций Т-клеток и изменению экспрессии указанных молекул при неосложненной и осложненной гестации. Завершает обзор глава, суммирующая известные данные об иммуномодулирующей активности фактора роста эндотелия сосудов (VEGF-A) и фактора роста плаценты (PlGF). Литературный обзор написан грамотным языком, логично выстроен и структурирован, позволяет лучше оценить результаты исследований и свидетельствует о знании автором современной литературы.

В разделе «Материалы и методы» автор описывает принципы отбора пациенток, подходы к оценке иммуномодулирующей активности PlGF *in vitro*, представлено детальное описание используемых иммунологических методов и методов статистической обработки. Все используемые методы и подходы современны, адекватны и позволяют достичь решения поставленных задач.

В главе 3 описаны собственные результаты. Первый блок исследований (главы 3.1-3.3) посвящен изучению эффектов PlGF на функции Т-клеток *in vitro*, включая пролиферацию, продукцию IL-10, активационно-индуцированный апоптоз и экспрессию Т-клетками ингибиторных рецепторов (PD-1, CTLA-4 и Tim-3). При исследовании влияния фактора на



пролиферацию активированных Т-клеток (глава 3.1) автором анализируется дозозависимость эффекта PlGF, чувствительность CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток к действию фактора и зависимость супрессорного эффекта от присутствия моноцитов. Эти данные в совокупности с исследованием экспрессии Т-клетками рецепторов к PlGF (VEGFR-1) и оценкой блокирования VEGFR-1 и VEGFR-2 (глава 3.2) позволяют прийти к заключению о прямом влиянии PlGF на пролиферацию Т-клеток (включая CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты), которое опосредуется через связывание фактора с VEGFR-1. Далее, автор демонстрирует (глава 3.3), что наряду с подавлением пролиферации Т-клеток PlGF усиливает продукцию IL-10 субпопуляциями CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов и уровень апоптоза CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов. Кроме того, фактор повышает экспрессию ингибиторных рецепторов, особенно Tim-3.

Последние две главы данного раздела (3.4 и 3.5) посвящены изучению экспрессии ингибиторных рецепторов на CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитах в группах беременных с высоким (неосложненная беременность) и сниженным (преэклампсия) уровнем PlGF. В главе 3.4. автором показано, что в сравнении с фертильными небеременными у женщин во второй половине неосложненной гестации отмечается возрастание периферических Т-клеток, экспрессирующих и коэкспрессирующих PD-1 и Tim-3. При этом сравнительный анализ у беременных с наличием и отсутствием сопутствующей экстрагенитальной патологии, показывает, что увеличение доли CD4<sup>+</sup>Tim-3<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> Т-клеток наблюдается в обеих подгруппах. Тем не менее, коморбидный статус ассоциирован с рядом особенностей в экспрессии ингибиторных рецепторов. Также автором показано, что факторами, сопряженными с экспрессией ингибиторных рецепторов при неосложненной гестации являются срок беременности и паритет родов.

В заключительной главе (3.5) при сопоставлении беременных с неосложненной гестацией и преэклампсией автором выявлено снижение экспрессии PD-1 и Tim-3 на Т-клетках, в совокупности с возрастанием экспрессии CTLA-4 в популяции CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов. При этом анализ экспрессии ингибиторных рецепторов у пациенток с умеренной и тяжелой преэклампсией, а также в подгруппах с ранней и поздней преэклампсией позволяет охарактеризовать ряд особенностей, ассоциированных с тяжестью и сроками манифестации данного гестационного осложнения.

В главе «Обсуждение» проведено обоснованное сопоставление полученных результатов с данными литературы.

Раздел «Заключение» посвящен подведению краткого итога проделанной работы.

Выводы подтверждены полученными результатами, обоснованы и соответствуют цели и задачам исследования.

Принципиальных замечаний к работе не имею, однако в порядке дискуссии хотел бы задать несколько вопросов:

1. В диссертационной работе часто встречается обсуждение общих механизмов действия фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) и плацентарного фактора роста (PlGF) на иммунную систему. А есть ли различия в эффектах, которые данные факторы вызывают при воздействии на Т-лимфоциты (*in vitro* и *in vivo*)?
2. В главе 2 «Материалы и методы» отмечено, что «Для изучения эффектов PlGF на Т-клетки *in vitro* использовали периферическую кровь 64 условно здоровых доноров крови, мужского и женского пола...». Оценивались ли особенности действия PlGF на Т-лимфоциты *in vitro* в зависимости от пола доноров? Имеются ли различия в эффектах PlGF на Т-клетки *in vitro* в зависимости от пола (по собственным результатам или из литературных данных)?
3. В разделе 3.1.1. «Эффект PlGF на пролиферацию активированных Т-клеток в культурах МНК» отмечено, что «Анализ индивидуальных значений показал, что концентрация PlGF, вызывающая наибольшее подавления пролиферативного ответа в культурах МНК разных доноров варьировала». Почему у разных людей концентрация PlGF, вызывающая наибольшее подавления пролиферативного ответа клеток, различается?

### Заключение

Диссертационная работа Екатерины Александровны Сметаненко «Плацентарный фактор роста в регуляции Т-клеточных функции и экспрессии ингибиторных рецепторов», представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.2.7 – Аллергология и иммунология, является завершенной научной квалификационной работой, выполненной на высоком методическом уровне и представляющей интерес для решения важной проблемы современной клинической иммунологии. По актуальности избранной темы, поставленных задач, новизне и значимости полученных результатов работа полностью соответствует критериям пункта 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утверждённого Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года «О порядке присуждения ученых степеней» (с изменениями в соответствии с Постановлением Правительства Российской Федерации № 335 от 21 апреля 2016 года, № 748 от 2 августа 2016 года, № 650 от 29 мая



2017 года, № 1024 от 28 августа 2017 года, № 1168 от 1 октября 2018 года «О внесении изменений в Положение о присуждении ученых степеней»), предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени кандидата наук, а её автор заслуживает присуждения искомой учёной степени кандидата медицинских наук по специальности 3.2.7 – Аллергология и иммунология.

26.05.2023

Официальный оппонент:

Заведующий лабораторией молекулярно-клеточной физиологии и патологии ФГБУНУ

«Федеральный исследовательский центр

«КНЦ СО РАН» обособленное подразделение

«НИИ МПС»,

доктор медицинских наук, профессор

Савченко Андрей Анатольевич



Савченко Андрей Анатольевич, доктор медицинских наук (14.03.03 – патологическая физиология), профессор (по специальности «Патологическая физиология»), руководитель лаборатории клеточно-молекулярной физиологии и патологии федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук» (ФИЦ КНЦ СО РАН), обособленного подразделения «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера», 660022, Красноярский край, г. Красноярск, ул. Партизана-Железняка, д. 3Г, тел. +7 (391) 228-06-62, web-сайт <http://www/impn.ru>, e-mail: [clinic@impn.ru](mailto:clinic@impn.ru). Контактные данные автора отзыва: тел. +7 (391) 212-52-63, +7 (905) 971-37-15; e-mail: [immun@impn.ru](mailto:immun@impn.ru), [aasavchenko@yandex.ru](mailto:aasavchenko@yandex.ru)