

## О Т З Ы В

официального оппонента доктора медицинских наук Талаева

Владимира Юрьевича на диссертационную работу

Курочкиной Юлии Дмитриевны «Эффект глюкокортикоидов на функции интерферон-альфа индуцированных дендритных клеток здоровых доноров и больных ревматоидным артритом», представленную на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология

### Актуальность

Как известно, дендритные клетки (ДК) являются наиболее активными антигенпрезентирующими клетками, способными вовлекать Т-лимфоциты в адаптивный иммунный ответ. В то же время, ДК, созревшие в определенных условиях, способны участвовать в формировании иммунной толерантности, в первую очередь, к аутоантигенам за счет стимуляции регуляторных Т-клеток, а также клональной делеции и/или индукции анергии эффекторных аутореактивных Т-лимфоцитов. ДК с такими свойствами, так называемые толерогенные ДК, привлекают все большее внимание в качестве потенциальных мишеней медикаментозного воздействия или кандидатов для клеточной терапии при аутоиммунной патологии. В связи с этим получение и характеристика толерогенных ДК, в том числе у пациентов с аутоиммунными заболеваниями, представляется важной научно-практической задачей. Решению этой задачи, а именно исследованию условий созревания и характеристике свойств толерогенных ДК у больных ревматоидным артритом, посвящена диссертация Юлии Дмитриевны Курочкиной. Учитывая применение глюкокортикоидов в терапии ревматоидного артрита и важную роль интерферонов I типа в запуске и поддержании аутоиммунного воспаления, диссертант в качестве основного объекта исследований избрал ДК, созревшие под действием интерферона- $\alpha$  и гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора в присутствии дексаметазона в качестве агента, индуцирующего толерогенные свойства. Данный выбор, полностью отвечающий цели диссертации, позволил автору охарактеризовать особенности созревания клеток иммунной системы при ревматоидном артрите и наметить пути разработки нового способа таргетной иммунотерапии данного заболевания. Таким образом, диссертационная работа Юлии Дмитриевны Курочкиной является актуальной и имеет как фундаментальное, так и прикладное значение.



### **Степень обоснованности научных положений и выводов, сформулированных в диссертации**

Обоснованность научных положений и выводов не вызывает сомнений. Исследования проведены в полном соответствии с поставленными целью и задачами диссертации, проведены на достаточной выборке доноров и пациентов. Автором охарактеризовано не только влияние глюкокортикоидов на индуцированную интерфероном- $\alpha$  дифференцировку ДК, но и исследованы механизмы ингибирующего действия полученных *in vitro* толерогенных ДК на функции Т-лимфоцитов у больных ревматоидным артритом. Работа проведена на высоком методическом уровне с использованием современных иммунологических методов, включая проточную цитометрию, мультиплексный протеомный анализ, иммуоферментный анализ, сепарацию и культивирование клеток, а также адекватные методы статистической обработки. Научные положения и выводы, сформулированные в диссертации, обоснованы и заслуживают доверия. Результаты работы обсуждены на научных конференциях и опубликованы в рецензируемых журналах. Положения, выносимые на защиту, базируются на полученных результатах. Выводы диссертации в полной мере отражают результаты исследований.

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

Автором впервые охарактеризовано действие глюкокортикоидов на индуцированное интерфероном- $\alpha$  созревание ДК из моноцитов крови здоровых доноров и больных ревматоидным артритом. Впервые проведен сравнительный анализ толерогенного действия глюкокортикоидов на ДК, созревающих под действием интерферона- $\alpha$  (ИФН-ДК) и под действием ИЛ-4 (ИЛ4-ДК). Кроме того, в работе впервые не только продемонстрирован ингибирующий эффект модулированных дексаметазоном ИФН-ДК на аутологичные Т-лимфоциты больных ревматоидным артритом, но и описаны механизмы этого ингибирующего эффекта.

### **Научно-практическая значимость**

Научная значимость представленной работы заключается в расширении знания о свойствах ДК, в частности, дексаметазон-модифицированных ИФН-ДК. Выявлены общие и отличительные свойства ИФН-ДК и ИЛ4-ДК, и показано, что модифицированные дексаметазоном ИФН-ДК по ряду свойств превышают толерогенную активность модифицированных дексаметазоном ИЛ4-ДК. Продemonстрировано, что ИФН-ДК больных ревматоидным артритом сохраняют чувствительность к толерогенному действию



дексаметазона, и модифицированные дексамктазоном ИФН-ДК этих пациентов эффективно подавляют функции аутологичных Т-клеток. Практическая ценность работы заключается в характеристике толерогенных свойств ДК, что обосновывает возможность их применения в терапии ревматоидного артрита. При этом выявление наибольшей толерогенной активности модифицированных ДК у больных ревматоидным артритом после пульс-терапии глюкокортикоидами определяет оптимальный временной период для генерации толерогенных ДК.

### **Конкретные рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации**

Материалы диссертации могут использоваться в программах преподавания иммунологии в медицинских и биологических ВУЗах. Полученные результаты также могут быть включены в программы клинической ординатуры и аспирантуры. Полученные знания являются научным обоснованием для дальнейшей апробации иммунотерапевтических подходов с использованием дендритных клеток в комплексном лечении ревматоидного артрита.

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

Диссертация написана в традиционном стиле, изложена на 146 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, 5 глав собственных исследований, обсуждения, заключения и выводов, хорошо иллюстрирована (19 таблиц и 15 рисунков). Список литературы содержит 215 литературных источников.

Во введении автор обосновывает выбор темы, привлекая внимание к факту недостаточной изученности ДК, генерируемых в присутствии интерферона- $\alpha$ , а также об отсутствии данных о возможности генерации таких ДК у больных ревматоидным артритом. Цель сформулирована четко, задачи адекватны поставленной цели. Положения, выносимые на защиту, отражают наиболее существенные результаты проведенного исследования.

Обзор литературы изложен на 27 страницах текста и посвящен краткой характеристике ДК, описанию их фенотипических и функциональных свойств. Также приводятся данные по клинической характеристике и методам лечения ревматоидного артрита. Приводится характеристика свойств ДК крови и синовиальной оболочки при данном заболевании. Описаны основные подходы к генерации толерогенных ДК при аутоиммунной патологии и дан анализ их терапевтического потенциала. В обзоре изложены достижения последних лет, что позволяет достаточно полно раскрыть состояние научной



проблемы, которой посвящена диссертация. Обзор литературы логично подводит к цели и задачам, сформулированным автором.

В главе «Материалы и методы» подробно описаны объект и методы исследования. Количество обследованных составляет 45 здоровых доноров крови и 54 больных ревматоидным артритом. Автором подробно описаны использованные в работе культуральные и иммунологические методы исследования, описаны все детали генерации ДК *in vitro*. Избранные автором методы исследований современны и вполне адекватны поставленным задачам.

В пяти разделах главы 3 описаны результаты собственных исследований. Первый раздел посвящен изучению свойств ИФН-ДК, генерируемых в присутствии дексаметазона у здоровых доноров. Полученные в данном разделе результаты свидетельствуют о том, что генерируемые в присутствии дексаметазона ИФН-ДК приобретают не только фенотипические, но и функциональные свойства толерогенных ДК, что обуславливает целесообразность дальнейшего исследования. Вторая часть третьей главы посвящена сравнительному исследованию свойств ИНФ-ДК, генерируемых в присутствии интерферона- $\alpha$  и интерлейкина-4. Автором изучены фенотипические и функциональные характеристики исследуемых типов ДК. Показано, что дексаметазон-модифицированные ИФН-ДК по ряду параметров обладают более выраженным толерогенным потенциалом, что обосновывает возможность их использования в качестве новой клеточной платформы для получения толерогенных ДК-вакцин. В разделе 3.3 исследуются свойства ИФН-ДК и их чувствительность к ингибирующему действию дексаметазона у больных ревматоидным артритом. Автором показано, что ДК больных чувствительны к толерогенному действию дексаметазона и при внесении его в культуру клеток приобретают признаки толерогенных, что обуславливает возможность дальнейшего исследования этого типа клеток. В следующей главе (3.4) автор последовательно описывает механизмы толерогенного воздействия модифицированных дексаметазоном ИНФ-ДК на аутологичные Т-лимфоциты больных ревматоидным артритом. Полученные автором результаты демонстрируют, что модифицированные ДК, обладают толерогенным эффектом в культурах аутологичных Т-лимфоцитов, индуцируя состояние гипореактивности Т-клеток. Кроме того, показан супрессорный эффект модифицированных дексаметазоном ДК больных на пролиферацию аутологичных Т-клеток, стимулированных контрольными ДК. В завершающем разделе результатов собственных исследований описано влияние глюкокортикоидов на ДК *in vivo*. Показан



более выраженный толерогенный потенциал модифицированных ДК у пациентов после проведения пульс-терапии глюкокортикоидами, как по сравнению со здоровыми донорами, так и с пациентами, получающими болезнь-модифицирующие препараты, что свидетельствует о реализации толерогенного эффекта глюкокортикоидов на моноциты и ДК *in vivo*. Раздел, представляющий собственные результаты, изложен понятно, последовательно и аргументировано.

В разделе «Обсуждение» автор подвергает полученные результаты анализу и сопоставлению с данными литературы. Итоги работы подведены в разделе «Заключение». Выводы полностью вытекают из основных положений диссертации и соответствуют поставленным задачам.

В целом, диссертационную работу Курочкиной Ю.Д. можно оценить как существенное дополнение к исследованиям последних лет. К достоинствам диссертационной работы Ю.Д. Курочкиной можно отнести качественный анализ данных литературы, тщательное планирование работы, успешное использование современных методов исследования. Работа также импонирует постановкой и решением задач, имеющих как фундаментальный, так и прикладной характер.

В качестве замечания можно отметить следующее:

1) Часто используемая автором формулировка о том, что модифицированные дексаметазоном ИНФ-ДК подавляют (или ингибируют) пролиферацию (или иную функцию) лимфоцитов не вполне точно отражает результаты, полученные в аллогенной смешанной культуре. По моему мнению, результатам, полученным в данной модели, точнее соответствует заключение о том, что дексаметазон ингибирует стимулирующее действие ДК на определенную функцию лимфоцитов, или о том, что ДК, модулированные дексаметазоном, утрачивают способность стимулировать лимфоциты. Следует отметить, что способность модифицированных дексаметазоном ДК ингибировать пролиферацию лимфоцитов (в самом строгом смысле этого выражения) автором блестяще показана в двух вариантах сложных аутологичных смешанных культур, когда исследуемые толерогенные клетки подавляли пролиферацию лимфоцитов, индуцированную контрольными «стимулирующими» ДК. Также следует отметить, что утрата способности стимулировать лимфоциты, документированная автором в аллогенных смешанных культурах, является облигатным свойством толерогенных ДК. Таким образом, это замечание не носит принципиальный характер, не умаляет научного достоинства работы и не влияет на смысл выводов.



2) Выбор ИЛ-6 в качестве показательного противовоспалительного цитокина и основного индикатора активности Т-хелперов второго типа (Тх2) в смешанной культуре представляется не вполне удачным. Во-первых, ИЛ-6 обладает смешанными функциями про- и противовоспалительного цитокина. Во-вторых, он продуцируется разнообразными клетками, включая ИНФ-ДК. В связи с этим, чрезвычайно сложно оценить, кто именно секретирует ИЛ-6 в смешанных культурах: Т-лимфоциты или ДК. Тем не менее, данное замечание также не носит принципиального характера, поскольку автор используя мультиплексный анализ оценил продукцию множества цитокинов в смешанных культурах, включая цитокины, бесспорно специфичные для Тх2 (ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-13). Данные по продукции этих цитокинов полностью подтверждают вывод диссертанта об относительной сохранности функции Тх2 при взаимодействии лимфоцитов с модифицированными дексаметазоном ИНФ-ДК.

Аннотация полностью отражает содержание диссертации. Основные положения, выносимые на защиту, и результаты диссертационного исследования представлены в 13 опубликованных работах, включая статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ, а также индексируемых в базах Scopus и Web of Science.

Диссертационная работа по своему содержанию полностью соответствует специальности 14.03.09-клиническая иммунология, аллергология.

## **Заключение**

Таким образом, представленная к защите диссертация Курочкиной Юлии Дмитриевны «Эффект глюкокортикоидов на функции интерферон-альфа индуцированных дендритных клеток здоровых доноров и больных ревматоидным артритом» является самостоятельной законченной научной квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований решена важная в научном и практическом отношении задача по исследованию влияния дексаметазона на свойства интерферон- $\alpha$ -индуцированных дендритных клеток у доноров и больных ревматоидным артритом. По актуальности избранной темы, поставленных задач, новизне и значимости полученных результатов, обоснованности научных выводов работа Курочкиной Ю.Д. соответствует требованиям п.9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013г №842, предъявляемым к кандидатским диссертациям на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук, а автор Курочкина Ю.Д. достойна присуждения ей ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология.

**Официальный оппонент:**

Заведующий лабораторией клеточной иммунологии  
Федерального бюджетного учреждения науки  
«Нижегородский научно-исследовательский институт  
эпидемиологии и микробиологии  
имени академика И.Н. Блохиной» Федеральной службы  
по надзору в сфере защиты прав потребителей  
и благополучия человека,  
доктор медицинских наук, профессор



Талаев В.Ю.

17 июля 2019

Почтовый адрес: 603950, Россия, г. Нижний Новгород, ул. Малая Ямская, д.71

Телефон: 8 (831) 469-79-01 ; 8 (831) 469-79-48

Сайт: <https://www.nniiem.ru/>, e-mail

[micro@nniiem.ru](mailto:micro@nniiem.ru)

Адрес электронной почты:

[talaev@inbox.ru](mailto:talaev@inbox.ru) ; [micro@sinn.ru](mailto:micro@sinn.ru)

Подпись д.м.н., профессора В.Ю. Талаева заверяю:

Ученый секретарь

ФБУН ННИИЭМ им.академика И.Н.Блохиной

Роспотребнадзора,

кандидат медицинских наук



Евплова И.А.