

## ОТЗЫВ

**официального оппонента кандидата биологических наук**  
**Мининой Юлии Михайловны на диссертационную работу**  
**Барковской Маргариты Шамилевны: «Субпопуляционный состав**  
**Т-клеток памяти и длина теломер на отдельных плечах индивидуальных хромосом**  
**при бронхиальной астме», представленную на соискание ученой степени**  
**кандидата медицинских наук по специальности – 14.03.09 –**  
**клиническая иммунология, аллергология**

### **Актуальность исследования**

Бронхиальная астма (БА) является хроническим заболеванием дыхательным путей и представляет собой серьезную проблему для современного здравоохранения. В 20 % случаев БА протекает в тяжелой форме, в некоторых случаях приводя к летальному исходу. Заболевание считается неизлечимым, а существующие медицинские препараты и методы лечения, такие как АСИТ или таргетная терапия, направлены в основном на купирование приступов и облегчение симптомов. На сегодняшний день распространённость этого заболевания в РФ, по разным оценкам, составляет от 3 до 20%, и эта цифра, судя по прогнозам, в будущем будет расти. Аналогичная тенденция наблюдается не только в России, но и других странах мира. Поскольку БА характеризуется большой вариабельностью клинических форм и разной выраженностью бронхиальной обструкции, то в настоящее время при определении фенотипа БА учитывают не только характер клинических проявлений, но и возраст манифестации, тип воспаления, триггерные факторы и другие признаки. Ключевую роль в патогенезе БА играют Т-лимфоциты памяти, при этом есть данные об изменении субпопуляционного состава Т-клеток памяти при БА, которые могут сопровождаться различными функциональными изменениями. Например, Т-клетки памяти обладают сниженным пролиферативным потенциалом по сравнению с наивными Т-клетками, что подтверждается данными об укорочении средней длины теломер. Длина теломер является маркером клеточного старения. Показано уменьшение средней длины теломер в лимфоцитах периферической крови (ПК) с возрастом, а так же при сердечно-сосудистых заболеваниях, атопическом дерматите и БА. Кроме того, укорочение теломер на определенных хромосомах лимфоцитов ПК связывают с возникновением некоторых онкологических заболеваний и ревматоидного артрита. В связи с этим, работа Маргариты



Шамилевны Барковской, направленная на изучение длины теломер на отдельных плечах индивидуальных хромосом в лимфоцитах и изменения субпопуляционного состава и пролиферативной активности наивных Т-лимфоцитов и Т-клеток памяти у больных БА, является, несомненно, актуальной.

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

Научная новизна работы заключается в том, что была изучена динамика длины теломер в иммунных клетках ПК у пациентов с БА на ранних этапах заболевания и при длительном течении. Кроме средней длины теломер в лимфоцитах автор сравнила длину теломер на индивидуальных хромосомных плечах у больных БА и здоровых доноров. Специально для этого исследования была модифицирована методика Q-FISH, которая позволила идентифицировать все хромосомы после эксперимента. Также было разработано программное обеспечение «MeTeLen» (Measurement of Telomere Length), которое минимизировало погрешности в измерениях, связанные с неравномерностью освещения при съемке микроизображений, фоновым свечением и другими факторами. Впервые было выявлено достоверное укорочение теломер на хромосомных плечах 6p, 9p, 9q, 11q и 13q у людей с БА. Кроме того, автор обнаружила корреляцию между длиной теломер индивидуальных хромосом с клинической неоднородностью и длительностью течения БА. Так было показано, что в дебюте экзогенной формы БА наблюдалось укорочение теломеры только на р-плече хромосомы 9, тогда как при длительно текущем заболевании укорочение теломер происходит на 17 хромосомных плечах. В настоящем исследовании автор впервые показала, что при экзогенной форме БА повышен уровень CD4<sup>+</sup> клеток памяти, при этом БА в дебюте характеризуется повышенным уровнем CD8<sup>+</sup> клеток памяти. Изучение субпопуляционного состава клеток памяти при экзогенной форме БА показало перераспределение в пользу субпопуляций CD4<sup>+</sup>Tem62L<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>Tem62L<sup>+</sup> при длительном течении, а при дебюте БА – только в пользу CD4<sup>+</sup>Tem62L.

### **Научная и практическая значимость**

Научная значимость проведенных исследований в рамках настоящей диссертации заключается в том, что выявленные особенности укорочения теломер на отдельных плечах индивидуальных хромосом при экзогенной форме БА дополняют знания о возможных паттернах укорочения теломер при различных формах БА. Данные об изменении субпопуляционного состава Т-клеток памяти вносят вклад в понимание



различного характера функционирования иммунной системы при экзогенной и эндогенной формах БА.

Практическая значимость данной работы заключается в том, что изученная динамика длины теломер на индивидуальных хромосомных плечах и изменение состава Т-клеток памяти и их отдельных субпопуляций при экзогенной форме БА могут послужить признаком индивидуальной предрасположенности к аллергическим заболеваниям. Результаты данной работы можно использовать для дальнейшего поиска маркеров или предикторов неблагоприятного исхода БА, связанных с длиной теломер и клетками памяти. Кроме того, практическую значимость диссертации подтверждают разработанные для отслеживания динамики длины теломер протокол модифицированного Q-FISH и программное обеспечение «MeTeLen», на которое получено свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ №2016614696 «Оценка длины теломерных районов хромосом (MeTeLen) / Measurement of telomere length on chromosome (MeTeLen)».

### **Общая характеристика работы**

Диссертация изложена на 179 страницах машинописного текста, включающего 6 таблиц и 25 рисунков, и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, обсуждения полученных результатов, заключения и выводов. Список цитируемой литературы содержит 285 литературных источников, в том числе 271 зарубежных.

Во введении автор обосновывает актуальность своего исследования, описывая, какие трудности возникают при определении фенотипа бронхиальной астмы при постановке диагноза из-за клинической неоднородности данного заболевания.

Цель сформулирована четко, для достижения которой автор ставит перед собой 5 задач. В основных положениях, выносимых на защиту, автор приводит самые значимые результаты диссертационной работы. Апробация материалов диссертации состоялась как минимум на 7 конференциях.

Обзор литературы написан логично и полно, он состоит из 3 подглав. В первой подглаве автор приводит современные представления о патогенезе БА. Затронуты проблемы фенотипической классификации заболевания. Обсуждено влияние генетических, эпигенетических и других факторов в патогенезе БА. Во второй подглаве автор дает общее представление о клетках памяти, описывает фенотипические и функциональные характеристики Т-клеток памяти, в том числе, что происходит с ними при иммунопатологических заболеваниях. Третья подглава посвящена теломерам и их



функциям, а так же тому, как меняется длина теломер при различных средовых факторах и заболеваниях.

Глава «Материалы и методы исследования» написана достаточно подробно и четко. Следует отметить, что автор результативно использовал современные клеточные, молекулярно-биологические, иммунологические и статистические методы, непосредственно связанные с тематикой исследования. Дана характеристика лиц, включенных в исследование, в котором участвовало 31 пациент с заболеванием БА и 30 условно-здоровых доноров.

Третья глава диссертации содержит 5 подглав, в которых последовательно и подробно изложены результаты собственных исследований. Первая часть посвящена описанию разработки программного обеспечения «MeTeLen», с помощью которого производилась нормировка и коррекция изменений интенсивности сигналов при Q-FISH. Во второй и третьей подглаве автор подробно описывает, как подбирались условия для Q-FISH, чтобы можно было идентифицировать каждую хромосому после гибридизации *in situ*, а так же о валидации программного обеспечения и модифицированной методики Q-FISH для оценки теломер у пациентов с ревматоидным артритом. В четвертой части автор дает характеристику теломерных профилей у здоровых доноров и пациентов с БА. Показано, что у пациентов с БА по сравнению со здоровыми донорами достоверно укорочены теломерные районы на 6p, 9p, 9q, 11q и 13q плечах. При этом показатель средней длины теломер у пациентов с БА не отличался от такового у здоровых доноров. При исследовании динамики длины теломер у пациентов с разными формами БА автор выявил укорочение теломер на 12 хромосомных плечах только у пациентов с экзогенной формой БА. При этом в дебюте заболевания экзогенной формы БА выявлено достоверное укорочение на обоих плечах хромосомы 9, тогда как при длительном течении (более 2 лет) укорочение теломер зарегистрировано уже на 19 хромосомных плечах. В пятом разделе автор дает характеристику фенотипического состава Т-клеток памяти и наивных Т-лимфоцитов при БА. Показано, что у пациентов с БА повышено содержание  $CD4^{+}Tem62L^{+}$  и  $CD8^{+}Tem62L^{+}$  клеток памяти и снижено содержание  $CD4^{+}Tcm62L^{-}$  и  $CD8^{+}Tcm62L^{-}$  клеток памяти в ПК по сравнению со здоровыми донорами. Процентное содержание клеток в субпопуляциях Tnaive и Temra у пациентов с БА и здоровых доноров не отличалось. Кроме того, автор сравнил пролиферативную активность и изменение субпопуляционного состава Т-клеток памяти и наивных Т-клеток в ответ на поликлональную стимуляцию *in vitro* у пациентов с БА и здоровых доноров. Пролиферативная активность различных субпопуляций Т-клеток памяти и наивных Т-лимфоцитов в ответ на ФГА соотносилась с уровнем донорских показателей. Сравнение



числа пролиферирующих клеток между разными субпопуляциями в пределах групп доноров и пациентов показало, что в обеих группах  $CD8^{+}Tcm62L^{+}$  и  $CD8^{+}Tnaive62L^{+}$  клетки делились более активно, чем  $CD8^{+}Tem62L^{+}$  и  $CD8^{+}Temra62L^{+}$  клетки. Аналогичным образом пролиферировали субпопуляции  $CD4^{+}$  клеток памяти.

В главе «Обсуждение» автором проанализированы результаты исследования в сравнении с данными мировой литературы.

«Заключение» диссертационной работы содержит краткое резюме, охватывающее основные моменты проведенных исследований. Выводы сформулированы четко и соответствуют поставленным задачам.

В целом, работа М.Ш. Барковской производит хорошее впечатление. Диссертационная работа М.Ш. Барковской представляет собой высокого качества научно-исследовательскую работу по одной из самых актуальных проблем современной иммунологии и может рассматриваться как самостоятельное научное квалификационное исследование, выполненное на высоком теоретическом и методическом уровнях.

#### **Достоверность и обоснованность полученных данных**

Результаты, представленные в данной работе, получены лично автором. Обоснованность и достоверность результатов и выводов, сформулированных в диссертации, подтверждается логичным обзором современных литературных данных, применением современных методов исследования и тщательной оценкой клинических данных. Адекватно выбраны статистические методы анализа с использованием непараметрических методов статистики.

Автореферат полностью отражает содержание диссертации. Основные положения, выносимые на защиту, и результаты диссертационного исследования представлены в 12 опубликованных работах, в том числе в 3 статьях в журналах, рекомендованных ВАК РФ, и получено 1 свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ №2016614696.

#### **Замечания и вопросы**

В тексте диссертации имеются орфографические и пунктуационные погрешности, которые не влияют на её общую положительную оценку. У меня есть пара замечаний рекомендательного характера. При изучении размера теломер при различных формах БА численность группы, участвующей в исследовании, составляла 5-7 человек. Данные мировой литературы указывают на то, что длина теломер индивидуумов сокращается с



разной скоростью у мужчин и женщин в интервале от 20 до 50 лет. Кроме того, на длину теломер отрицательно влияют многие факторы: курение постоянное или периодическое, психологический стресс, лишний вес, число родов у женщин, хронические заболевания, низкая физическая активность, употребление алкоголя и др. В связи с этим, для весомости полученных результатов и сделанных выводов я бы рекомендовала увеличить число пациентов в изучаемой группе.

Далее, автор в главе «Обсуждение» описывает возможный позиционный эффект теломер, который заключается в том, что при укорочении теломер может изменяться экспрессия генов, лежащих близко к теломерам. Вместе с тем, многие идентифицированные кластеры генов, ассоциированные с БА, находятся на тех плечах хромосом, где происходит достоверное укорочение теломер при длительном течении БА. На мой взгляд, было бы очень интересно посмотреть, как меняется экспрессия выборочных генов у больных БА в дебюте и при длительном течении, например, используя метод Real-time PCR. Этот метод удобен тем, что довольно прост в исполнении, не занимает много времени и дает довольно точную сравнительную оценку между двумя образцами.

При прочтении диссертации возникло ряд вопросов автору:

1. Использовали ли пациенты с БА, включенные в исследование, длительную или периодическую терапию ГКС во время исследования или до него?
2. Как по вашему, может ли терапия, направленная на подавление воспаления у больных БА изменить динамику укорочения теломер?
3. В диссертационной работе длина теломер дается в относительных единицах флуоресценции. Можно ли, опираясь на литературные данные о размерах теломер у человека, хотя бы примерно соотнести относительные единицы флуоресценции с реальным размером в кб, чтобы иметь реальное представление о масштабах изменения длины теломер при заболевании БА?

### **Заключение**

Можно уверенно говорить, что диссертационная работа М.Ш. Барковской «Субпопуляционный состав Т-клеток памяти и длина теломер на отдельных плечах индивидуальных хромосом при бронхиальной астме» полностью соответствует требованиям, предъявляемым кандидатским диссертациям (п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» утвержденного постановлением Правительством РФ № 842 от 24.09.2013 г. с изменениями постановлений Правительства РФ № 335 от 21.04.2016



г., № 748 от 02.08.2016 г.), а автор ее, Маргарита Шамилевна Барковская, заслуживает присвоения степени кандидата медицинских наук по специальности – 14.03.09 – «Клиническая иммунология, аллергология»

Официальный оппонент

Научный сотрудник лаборатории генетики развития  
Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук»  
Кандидат биологических наук  
(по специальности 03.02.07 – генетика)  
Минина Юлия Михайловна




Минина Ю.М.

Почтовый адрес: 630090, г. Новосибирск, проспект академика Лаврентьева, д. 10  
Тел.: +7(383) 363-49-80  
Сайт: <http://www.bionet.nsc.ru/>; E-mail: [icg-adm@bionet.nsc.ru](mailto:icg-adm@bionet.nsc.ru)  
Адрес электронной почты: [minina\\_jul@bionet.nsc.ru](mailto:minina_jul@bionet.nsc.ru)

Подпись к.б.н. Мининой Юлии Михайловны заверяю  
Ученый секретарь к.б.н. Орлова Г.В.



 2 декабря 2019г.