

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального государственного
бюджетного учреждения науки Институт
иммунологии и физиологии Уральского
отделения Российской академии наук
д.ф.-м.н., профессор О. Э. Соловьева



Соловьева

« 22 » октября

2020 года

ОТЗЫВ

о научно-практической значимости диссертационной работы

Шевырева Даниила Вадимовича

**«Влияние гуморальных факторов гомеостатической пролиферации на Т-регуляторные
клетки в норме и при ревматоидном артрите *in vitro*»**

на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

по специальности «14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология»

Актуальность темы

Диссертация Шевырева Д. В. «Влияние гуморальных факторов гомеостатической пролиферации на Т-регуляторные клетки в норме и при ревматоидном артрите *in vitro*» посвящена актуальной проблеме и направлена на изучение влияния гуморальных факторов гомеостатической пролиферации IL-7 и IL-15 на функциональную и пролиферативную активность Т-регуляторных клеток здоровых доноров и пациентов с ревматоидным артритом. Ревматоидный артрит (РА) – одно из наиболее распространенных аутоиммунных заболеваний человека. Высокий риск потери трудоспособности и стоимость лечения делают это заболевание серьезной социально-экономической проблемой современности. Известно, что процесс гомеостатической пролиферации (ГП) Т-лимфоцитов и Т-регуляторные клетки (Treg) играют важные роли в патогенезе РА, однако взаимосвязь этих двух факторов в настоящее время не изучена. Сравнительное исследование количественных и функциональных особенностей общего пула Treg периферической крови и их изменения при воздействии цитокинов гомеостатической пролиферации IL-7 и IL-15 у пациентов с РА в сравнении со здоровыми лицами является важной задачей современной иммунологии.

Тема диссертации полностью соответствует специальности «14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология».

Основные результаты

В результате исследований автором был разработан протокол культивирования лимфоцитов, позволяющий изучать функциональную активность Treg *in vitro* в условиях аналогичных медленной и быстрой гомеостатической пролиферации CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцитов человека. В результате проведенных экспериментов было показано, что Treg способны эффективно подавлять медленную пролиферацию CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцитов, вызванную гомеостатическими цитокинами – IL-7 и IL-15. Однако при этом было обнаружено существенное снижение способности Treg подавлять быструю пролиферацию CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцитов, вызванную цитокинами ГП (IL-7 или IL-15) в сочетании с сильной стимуляцией TCR anti-CD3-антителами. Также при сравнительной оценке супрессорной активности общего пула Treg периферической крови не было выявлено достоверных отличий между условно-здоровыми донорами и пациентами с РА во всех изученных условиях стимуляции. Кроме этого при сравнении супрессорной активности Treg у пациентов с разной активностью и продолжительностью заболевания не было выявлено значимых отличий между исследуемыми группами. Эти данные указывают на сохранение функциональной активности общего пула Treg периферической крови при РА на уровне здоровых доноров.

Автором был изучен субпопуляционный состав и фенотипические характеристики Treg периферической крови условно-здоровых доноров и пациентов с РА. При сравнительном анализе были выявлены существенные изменения фенотипических характеристик Treg при РА. Так в периферическом кровотоке пациентов с РА наблюдалось повышенное содержание Treg с низкой экспрессией молекулы CD25 и сниженное содержание Treg с высокой экспрессией CD25. Кроме этого у пациентов с РА было выявлено повышенное содержание CD4⁺RORγt⁺FoxP3⁺ и CD4⁺RORγt⁺FoxP3⁺-лимфоцитов, которое коррелировало с активностью заболевания. Также в отличие от здоровых доноров, в периферической крови пациентов с РА было обнаружено пониженное количество Treg, экспрессирующих CTLA-4 и повышенное содержание CCR4⁺Treg, которые представляют эффекторные T-регуляторные клетки.

Автором было исследовано влияние гуморальных факторов ГП – IL-7 и IL-15 на экспрессию основных функциональных молекул Treg (PD-L1, CTLA-4, CCR4 и HLA-DR), а также на продукцию супрессорных цитокинов TGF-β и IL-10. В работе было показано, что цитокины IL-7 и IL-15 не способны обеспечивать такой же уровень активации Treg, как стимуляция TCR anti-CD3-антителами в сочетании с IL-2, которая представляет классический механизм поддержания функциональной активности Treg. При этом уровень продукции

цитокинов TGF- β и IL-10 в группе пациентов под влиянием стимуляции anti-CD3+IL-2 был значимо выше, чем в группе доноров, что, по мнению автора, может быть связано с повышенной активацией Treg или применяемой терапией.

В работе была показана способность цитокинов ГП участвовать в гомеостазе Treg за счет поддержания экспрессии транскрипционного фактора FoxP3 и за счет индукции пролиферации этих клеток, как у доноров, так и у пациентов с РА. Однако пролиферативная активность Treg под влиянием IL-7 и IL-15 у пациентов оказалась значительно ниже, чем у здоровых доноров, что, по мнению автора, может приводить к запаздыванию восстановления пула Treg после лимфопении при РА.

Достоверность полученных результатов

Диссертационная работа выполнена на высоком научном и методическом уровне. Современные методы исследования, тщательный анализ экспериментальных данных, релевантные методы статистического анализа обеспечивают достоверность полученных результатов. Выводы обоснованы результатами исследований и четко сформулированы.

Научная новизна

Научная новизна диссертационной работы состоит в комплексном подходе к изучению влияния факторов ГП на фенотипические характеристики, функциональную и пролиферативную активность Treg у пациентов с РА в сравнении со здоровыми добровольцами. В ходе работы впервые было исследовано влияние цитокинов ГП на фенотипические характеристики Treg при РА. Было установлено, что IL-7 и IL-15 способны индуцировать экспрессию молекулы PD-L1 на Treg в обеих группах доноров и пациентов с РА, при этом процентное содержание PD-L1⁺ Treg под влиянием гуморальных факторов ГП не увеличивается. В то время как стимуляция анти-CD3-антителами в комбинации с IL-2 достоверно увеличивала не только плотность экспрессии (MFI) молекул PD-L1 и CTLA-4, но и содержание Treg, экспрессирующих PD-L1, CTLA-4, HLA-DR и CCR4.

Впервые было изучено влияние факторов ГП – IL-7 и IL-15 на способность Treg подавлять пролиферацию CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцитов. При этом было установлено, что Treg с высокой эффективностью подавляют медленную пролиферацию CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцитов, вызванную цитокинами ГП – IL-7 и IL-15, однако когда действие этих цитокинов сопровождается сильной стимуляцией TCR anti-CD3-антителами, способность Treg подавлять такую пролиферацию, аналогичную быстрой ГП, резко снижается.

Впервые было проведено сравнительное исследование супрессорной активности Treg условно-здоровых доноров и пациентов с РА под влиянием факторов ГП. При этом не было

выявлено достоверных отличий в способности Treg подавлять пролиферацию CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцитов между здоровыми донорами и пациентами с РА во всех изученных условиях стимуляции.

Теоретическая и практическая значимость

В настоящее время хорошо известно, что увеличение риска развития аутоиммунных заболеваний, в том числе РА, связано с процессом ГП, которая в норме представляет физиологический процесс, направленный на восполнение пула Т-лимфоцитов после лимфопении. Известно, что в зависимости от выраженности и продолжительности лимфопении, ГП может сопровождаться рядом негативных эффектов – снижением разнообразия репертуара TCR, отбором потенциально аутореактивных лимфоцитов, а также конверсией фенотипа наивных Т-лимфоцитов в Т-клетки памяти. Всё это может приводить к нарушению аутоотолерантности и способствует развитию аутоиммунных заболеваний. Однако роль Т-регуляторных клеток, которые должны сдерживать пролиферацию аутореактивных лимфоцитов в процессе ГП, до настоящего момента была изучена недостаточно. В этом контексте, выявленные в настоящей работе особенности влияния 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. В представленном исследовании было показано, что Treg с высокой эффективностью подавляют медленную ГП CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцитов, которая носит поликлональный характер, не требует сильного TCR сигнала и в большей степени зависит от цитокинов IL-7 и IL-15. Одновременно с этим было показано, что Treg, не способны подавлять быструю ГП CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцитов, которая требует сильного сигнала от TCR, в меньшей степени зависит от цитокинов IL-7 и IL-15, а также сопровождается конверсией фенотипа наивных Т-лимфоцитов в Т-клетки памяти. Стоит отметить, что в условиях лимфопении в быструю ГП вступают Т-лимфоциты, имеющие наибольшую аффинность TCR к пептиду в составе МНС. Учитывая, что всё возможное разнообразие антигенов не может быть представлено в организме одновременно, и подавляющее большинство антигенов является аутоантигенами в следствие кросспрезентации, то в быструю ГП вступают в основном аутореактивные клоны Т-лимфоцитов. Это представляется важным в контексте полученных данных о неспособности Treg подавлять быструю ГП. Таким образом, в физиологических условиях снижение супрессорной активности Treg может наблюдаться в отношении узкого спектра аутореактивных клонов Т-лимфоцитов, получающих сильный сигнал от TCR даже в условиях слабой лимфопении. Это может вносить существенный вклад

в снижение разнообразия репертуара TCR при ГП вне зависимости от её интенсивности и приводить к олигоклональной экспансии аутореактивных Т-лимфоцитов, повышая риск развития аутоиммунных заболеваний.

Также стоит отметить, что в проведенном исследовании не было выявлено снижения функциональной активности общего пула Treg периферической крови при РА. Способность подавлять пролиферацию Т-респондеров сохранялась на уровне здоровых доноров во всех условиях стимуляции, что свидетельствует об отсутствии внутренних дефектов со стороны общего пула Treg при РА. Однако автор предполагает, что это не исключает возможности существования дефектов на уровне клонов Treg, специфичных к аутоантигенам, в отношении которых нарушена ауто толерантность. Таким образом, по мнению автора перспективными представляются исследования, направленные на поиск клонов эффекторных и регуляторных Т-клеток обладающих специфичностью к антигенным детерминантам, в отношении которых нарушена толерантность.

Кроме того, в работе была обнаружена строгая корреляционная связь между активностью заболевания и содержанием переходных форм FoxP3⁺RORγt⁺ и CD4⁺RORγt⁺ лимфоцитов. В перспективе это может позволить использовать маркер RORγt, как дополнительный параметр при оценке активности РА.

Общая характеристика диссертационной работы

Диссертационная работа Шевырева Д.В. имеет классическую структуру и состоит из введения, литературного обзора, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 127 страницах машинописного текста и содержит 36 рисунков. Прилагаемая библиография содержит ссылки на 274 источника, из них 271 источник зарубежный.

Цель исследования сформулирована корректно и заключается в изучении влияния гуморальных факторов ГП IL-7 и IL-15 на фенотипические характеристики и функциональную активность Treg у пациентов с РА в сравнении со здоровыми донорами.

Обзор литературы написан логично, полностью соответствует теме диссертации, в полном объеме предоставляет современную информацию по теме исследования и обосновывает необходимость проведения данной работы.

Раздел «Материалы и методы» содержит подробное и иллюстрированное описание методов, использованных в исследовании. В исследовании используется широкий спектр современных иммунологических и молекулярно-биологических методов, включая многоцветную проточную цитометрию, магнитную сепарацию субпопуляций Т-клеток, ИФА,

а также работу по подбору условий культивирования лимфоцитов *in vitro*. Особо стоит отметить тщательность статистической обработки данных.

В разделе «Результаты» описываются результаты собственных исследований. Подробно описывается работа по подбору условий культивирования лимфоцитов максимально наглядно иллюстрирующих влияние IL-7 и IL-15 на фенотип, пролиферативную и супрессорную активность Treg пациентов с РА и здоровых лиц. Детально описываются фенотипические особенности различных популяций Treg у здоровых доноров и пациентов с РА.

В разделе «Обсуждение» автором проведен тщательный анализ собственных результатов и данных мировой научной литературы, что даёт основание для формирования полноценных выводов.

В «Заключении» автор кратко и емко обобщает полученные результаты.

Сформулированные выводы логичны и целиком вытекают из результатов исследования.

По теме диссертации опубликовано 10 печатных работ, в том числе 3 статьи в изданиях, рекомендованных ВАК для публикации материалов диссертационных работ, и 2 статьи в журналах, индексирующихся в базах Scopus и Web of Science.

Аннотация полностью отражает содержание диссертационной работы.

Заключение


Диссертационная работа Шевырева Д. В. «Влияние гуморальных факторов гомеостатической пролиферации на Т-регуляторные клетки в норме и при ревматоидном артрите *in vitro*» на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности «14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология» является научно-квалификационной работой, в которой произведены исследования направленные на решение актуальных вопросов современной фундаментальной и клинической иммунологии: был создан и оптимизирован протокол культивирования лимфоцитов *in vitro*, позволяющий изучать функциональную активность Treg в условиях аналогичных медленной и быстрой гомеостатической пролиферации CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцитов человека, произведен сравнительный анализ супрессорной активности общего пула Treg периферической крови между здоровыми донорами и пациентами с РА под влиянием факторов ГП, всесторонне изучено влияние факторов ГП на пролиферацию, функциональные и фенотипические характеристики Treg человека.

Диссертационная работа полностью соответствует требованиям, предъявленным к диссертациям на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, (п.9 «Положения о

присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842 с изменениями №335 от 21.04.2016 г., №748 от 02.08.2016 г.), а её автор Шевырев Даниил Вадимович заслуживает присуждения искомой степени кандидата медицинских наук по специальности «14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология».

Отзыв на диссертационную работу Шевырева Даниила Вадимовича подготовлен научным руководителем, главным научным сотрудником Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, обсужден и одобрен на заседании Ученого совета ИИФ УрО РАН протокол № 4 от «26» октября 2020 года

Научный руководитель ИИФ УрО РАН
профессор, академик РАН

 Черешнев В. А.

Подпись Черешнева В. А. заверяю
Главный специалист отдела кадров
ИИФ УрО РАН



Нахматулина Ю. А.

Контактная информация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук (ИИФ УрО РАН).

620049, Российская Федерация, г. Екатеринбург ул. Первомайская, д. 106.

E-mail: iip@iip.uran.ru

Телефон (факс): +7(343)3740070

Сайт: www.iip.uran.ru