

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 001.001.01 НА БАЗЕ
ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО НАУЧНОГО
УЧРЕЖДЕНИЯ «НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ И КЛИНИЧЕСКОЙ ИММУНОЛОГИИ» ПО
ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА
НАУК

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 26 ноября 2020 № 271

О присуждении Шевыреву Даниилу Вадимовичу, гражданину РФ,
ученой степени кандидата медицинских наук.

Диссертация «Влияние гуморальных факторов гомеостатической пролиферации на Т-регуляторные клетки в норме и при ревматоидном артрите *in vitro*» по специальности 14.03.09 – «Клиническая иммунология, аллергология» принята к защите 24 сентября 2020 года, протокол № 267 диссертационным советом Д001.001.01 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» (НИИФКИ), почтовый индекс 630099, адрес организации: г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, дом 14, действующего на основании приказа № 714 от 02.11.2012 года.

Соискатель Шевырев Даниил Вадимович, 1991 года рождения, с отличием окончил в 2014 году ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» с присвоением квалификации Врач по специальности «Педиатрия».

С 2014 по 2016 год проходил обучение в ординатуре в ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет», по окончании присвоена квалификация «Врач-педиатр».

В 2017 году прошел профессиональную переподготовку в ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» с присвоением квалификации «Скорая медицинская помощь».

С 2016 по 2019 годы проходил обучение в очной аспирантуре ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» (НИИФКИ) в лаборатории клинической иммунопатологии; с 2019 года по настоящее время занимает должность младшего научного сотрудника лаборатории клинической иммунопатологии НИИФКИ.

Диссертация выполнена в лаборатории клинической иммунопатологии отдела клинической иммунологии НИИФКИ.

Научный руководитель – академик РАН, доктор медицинских наук, профессор – Козлов Владимир Александрович, заведующий лабораторией клинической иммунопатологии, научный руководитель ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии».

Официальные оппоненты:

1. **Топтыгина Анна Павловна**, доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории цитокинов, Федеральное бюджетное учреждение науки Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора.
2. **Повещенко Ольга Владимировна**, доктор медицинских наук, руководитель лаборатории клеточных технологий, Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук».

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук (ИИФ УрО РАН) в своем положительном заключении, подписанном Черешневым Валерием Александровичем, доктором биологических наук, профессором, академиком РАН, научным руководителем, главным научным сотрудником, указала, что диссертационная работа Шевырева Даниила

Вадимовича является самостоятельной, завершенной 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 гомеостатической пролиферации (ГП), всесторонне изучено влияние факторов ГП на пролиферацию, функциональные и фенотипические характеристики Treg человека. По своей актуальности, методическому уровню, научной новизне, теоретической и практической значимости диссертационная работа Шевырева Д.В. полностью соответствует требованиям пункта 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 № 842 (ред. от 01.10.2018 г., с изменениями от 26.05.2020 г.), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а её автор заслуживает искомой ученой степени кандидата медицинских наук по специальности «14.03.09 - клиническая иммунология, аллергология».

По теме диссертации опубликовано 10 печатных работ, в том числе 3 статьи в изданиях, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией для публикации материалов диссертационных работ, и 2 статьи в журналах, индексирующихся в базах Scopus и Web of Science (Q1 и Q2).

Наиболее значимые научные работы по теме диссертации:

1. **Shevyrev D, Tereshchenko V.** Treg Heterogeneity, Function, and Homeostasis. *Front Immunol.* 2020; 10: 3100. Published 2020 Jan 14. doi:10.3389/fimmu.2019.03100

2. **Шевырев Д.В.**, Блинова Е.А., Козлов В.А. Влияние гуморальных факторов гомеостатической пролиферации на Т-регуляторные клетки *in vitro*. Бюллетень сибирской медицины. 2019;18(1):286-293.

3. **Шевырев Д.В.**, Козлов В.А., Омельченко В.О. Влияние IL-7 и IL-15 на Т-регуляторные клетки здоровых доноров и пациентов с ревматоидным артритом *in vitro*. Российский иммунологический журнал. 2019; 22(2-1): 653-656.

4. **Шевырев Д.В.**, Терещенко В.П., Козлов В.А. Гомеостатическая пролиферация: от нормы к патологии. Российский иммунологический журнал. 2018; 21(2): 91-105.

Все основные результаты, представленные на защиту, опубликованы в оригинальных статьях в рецензируемых изданиях и тезисах докладов в сборниках научных конференций. Вся экспериментальная работа, статистическая обработка полученных данных, а также представление результатов в виде публикаций были выполнены соискателем лично.

На автореферат поступило 3 отзыва:

1. кандидата биологических наук, старшего научного сотрудника Центра регенеративной медицины, Института регенерации и репарации, Университета Эдинбурга, Великобритания – **Рыбцова Станислава Александровича**;

2. доктора медицинских наук, профессора, главного научного сотрудника отдела клинико-экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии Центральной научно-исследовательской лаборатории, профессора кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК ППС ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава России – **Нестеровой Ирины Вадимовны**;

3. кандидата медицинских наук, доцента кафедры педиатрии Института профессионального образования ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России – **Мигачевой Натальи Бегиевны**.

Во всех отзывах отмечается высокая актуальность темы диссертационного исследования, научная и практическая значимость для фундаментальной и клинической иммунологии, современный методический уровень и оригинальный подход к достижению поставленных целей исследования. Отмечается, что автору удалось получить ряд важных результатов, касающихся особенностей влияния факторов ГП на супрессорную активность Т-регуляторных клеток (Treg) у здоровых доноров и пациентов с ревматоидным артритом. Среди полученных результатов отмечается, что автором в экспериментах были установлены условия, в которых функциональная активность Treg сохранена, а также условия, в которых она существенно снижается, что демонстрирует ранее неизученный механизм связи лимфопении с повышением риска развития аутоиммунных заболеваний. Кроме этого были выявлены фенотипические особенности Treg при ревматоидном артрите, а также изучена функциональная активность общего пула Treg периферической крови пациентов с ревматоидным артритом в сравнении со здоровыми донорами. Все отзывы положительные, критических замечаний не содержат.

Выбор ведущей организации обосновывается тем, что **ФГБУН ИИФ Уро РАН** является одним из ведущих научно-исследовательских институтов России, который осуществляет научные исследования по фундаментальным и практическим проблемам современной иммунологии и физиологии. В институте активно проводятся фундаментальные исследования по изучению вопросов иммунологической регуляции физиологических функций в норме и патологии; исследуются проблемы формирования функциональных систем в физиологических условиях и при патологии, а также широко используется математическое моделирование физиологических и патофизиологических процессов. Также большое внимание в институте уделяется изучению иммунорегуляторных механизмов восстановительного роста тканей при различных видах повреждения, а также разработке различных методов

иммунокоррекции и созданию иммуномодуляторов нового поколения. Ряд исследований посвящен роли Treg при различных патологиях.

Выбор официального оппонента, доктора медицинских наук **А. П. Топтыгиной**, обосновывается ее научными достижениями в области изучения клеточного и гуморального звеньев иммунитета при различных иммунопатологиях, в том числе ее работами по изучению Т-регуляторных и Th-17 лимфоцитов.

Выбор официального оппонента, доктора медицинских наук **О. В. Повещенко**, обосновывается ее достижениями в исследованиях клеточной иммунологии, цитологии, регенеративной медицины, а также исследованиями в области регуляции иммунитета.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

Доказано, что цитокины гомеостатической пролиферации (ГП) IL-7 и IL-15 поддерживают экспрессию транскрипционного фактора FoxP3 в культурах МНК как в группе доноров, так и у больных с ревматоидным артритом (РА).

Доказано, что цитокины ГП IL-7 и IL-15 вызывают пролиферацию Treg в культурах моноклеарных клеток, при этом пролиферативная активность Treg у больных РА значимо ниже, чем у здоровых доноров.

Доказано, что супрессорная активность общего пула Treg периферической крови больных РА сохраняется на уровне значений здоровых доноров.

Доказано, что *in vitro* регуляторные эффекты IL-7 и IL-15 на супрессорную активность Treg прямо зависят от условий культивирования: при отсутствии или слабом TCR сигнале супрессорная активность Treg сохраняется на высоком уровне, тогда как при сильном TCR сигнале при стимуляции анти-CD3-антителами резко снижается как у доноров, так и у больных РА.

Доказано, что по сравнению с донорами популяция циркулирующих Treg больных РА характеризуется рядом фенотипических отличий: 1) повышенным относительным содержанием CCR4⁺Treg; 2) сниженным количеством Treg экспрессирующих CTLA-4, а также 3) повышенным содержанием переходных

форм $CD4^+ROR\gamma^t^+FoxP3^-$ и $CD4^+ROR\gamma^t^+FoxP3^+$ Т-лимфоцитов, которое коррелирует с тяжестью заболевания.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что выявленные особенности влияния гуморальных факторов ГП на супрессорную активность Treg являются принципиально новыми данными, которые позволяют расширить современные представления о негативном влиянии ГП на иммунный баланс, и раскрывают дополнительный механизм нарушения аутоотолерантности и увеличения риска развития аутоиммунных заболеваний.

Применительно к проблематике диссертации:

Результативно использован комплекс экспериментальных методик, включающих современные иммунологические и молекулярно-биологические методы: выделение Treg с помощью магнитной сортировки, многоцветную проточную цитометрию, иммуноферментный анализ, методы выделения и культивирования клеток.

Изложены доказательства сохраненной функциональной активности общего пула Treg периферической крови пациентов с ревматоидным артритом, **показаны** фенотипические особенности популяции циркулирующих Treg у больных РА, а также **выявлены** корреляционные связи между содержанием Treg определенного фенотипа с активностью заболевания.

Изучены особенности влияния факторов ГП на иммунофенотип, пролиферативную и функциональную активность Treg у больных РА и здоровых доноров, **установлена** зависимость регуляторных эффектов IL-7 и IL-15 на супрессорную активность Treg от условий культивирования *in vitro*.

Раскрыт дополнительный механизм связи ГП с повышением риска развития аутоиммунных заболеваний, который заключается в значительном снижении супрессорной активности Treg в отношении Тлимфоцитов, активированных через Т-клеточный рецепторный комплекс (TCR) в присутствии цитокинов ГП IL-7 или IL-15.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики:

С научной точки зрения, **представленные** новые данные касательно сохранения функциональной активности общего пула Treg периферической крови при ревматоидном артрите обосновывают дальнейшее изучение репертуаров TCR эффекторных и регуляторных клеток с целью выявления дефектов на уровне клонов, специфичных к аутоантигенам, в отношении которых нарушена ауто толерантность. Выявление специфических клонов Т-лимфоцитов, которые участвуют в нарушении толерантности, позволит в перспективе использовать индивидуальные подходы к терапии аутоиммунных заболеваний, основанные на специфическом воздействии на эти клоны с помощью цитотоксических моноклональных антител или CAR-T-лимфоцитов;

С клинической точки зрения, **выявленная** корреляционная связь между активностью ревматоидного артрита и содержанием переходных форм $CD4^+FoxP3^+ROR\gamma t^+$ и $CD4^+ROR\gamma t^+FoxP3^-$ Т-лимфоцитов свидетельствует о возможности использования ROR γt , в качестве нового потенциального биомаркера активности заболевания.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что исследование проведено на сертифицированном оборудовании с использованием сертифицированных реагентов. Работа выполнена на высоком методическом уровне и достаточном по объёму материале. Достоверность полученных результатов обеспечивается правильным дизайном исследования, а также релевантными методами статистической обработки данных. Выводы соответствуют поставленным задачам, логически вытекают из полученных данных и отражают содержание работы.

Личный вклад соискателя заключается в разработке концепции и дизайна исследования, а также в проведении экспериментальной работы, получении и анализе исходных данных и теоретическом осмыслении и интерпретации полученных результатов. Автором лично был проведен всесторонний анализ имеющейся научной информации по теме исследования. Экспериментальная работа была проведена лично автором и включала выделение клеток, магнитную сортировку Treg, цитометрический анализ,

иммуноферментный анализ, анализ пролиферативной активности, а также оптимизацию протоколов культивирования и все работы *in vitro*. Статистическая обработка и интерпретация данных проведена лично автором. Научные положения и выводы, сделанные в диссертационной работе, обоснованы результатами собственных исследований. Включение больных РА в исследование проводилось совместно с сотрудниками отделения ревматологии клиники иммунопатологии НИИФКИ г. Новосибирска. Подготовка основных публикаций, отражающих результаты диссертационного исследования, проведена лично автором.

Диссертационная работа Шевырева Д.В. «Влияние гуморальных факторов гомеостатической пролиферации на Т-регуляторные клетки в норме и при ревматоидном артрите *in vitro*» является научно-квалификационной работой, в которой решена важная с практической и теоретической точки зрения задача – изучено влияние факторов гомеостатической пролиферации на иммунофенотип и функциональную активность Treg в норме и при ревматоидном артрите. По актуальности, методическому уровню, новизне, теоретической и практической значимости представленная работа полностью отвечает требованиям «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года №842 (в ред. Постановлений Правительства РФ от 21.04.2016 N 335, от 02.08.2016 N 748, от 29.05.2017 N 650, от 28.08.2017 N 1024, от 01.10.2018 N 1168, с изм., внесенными Постановлением Правительства РФ от 26.05.2020 N 751).

На заседании 26 ноября 2020 года диссертационный совет принял решение присудить Шевыреву Даниилу Вадимовичу ученую степень кандидата медицинских наук по специальности 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология.

Заседание диссертационного совета Д 001.001.01 проходило в интерактивном удаленном режиме с очным присутствием - 9 человек и дистанционным – 8

человек из 20 человек, входящих в состав совета.

При проведении открытого голосования диссертационный совет в количестве 17 человек, из них 8 докторов наук по специальности 14.03.09 - «Клиническая иммунология, аллергология» (медицинские науки), участвовавших в заседании, из 20 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за присуждение учёной степени 17, против присуждения учёной степени - 0, воздержались - 0 .

Заместитель председателя
диссертационного совета,
доктор медицинских наук, профессор

Сенников С. В.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Облеухова И. А.



26 ноября 2020 года