

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора медицинских наук Повещенко Ольги Владимировны на диссертационную работу 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

Диссертационная работа Сметаненко Е.А. посвящена изучению иммуномодулирующей активности плацентарного фактора роста (PlGF), являющегося одним из белков семейства факторов роста эндотелия сосудов (VEGF). Уровень данного проангиогенного фактора резко возрастает при неосложненной беременности, а снижение PlGF является предиктором тяжелого гестационного осложнения – преэклампсии. Поскольку беременность сопряжена с формированием иммунологической толерантности к отцовским аллоантигенам, а преэклампсию связывают с нарушением толерантности и активацией иммунной системы, автор задается вопросом о возможном участии PlGF в гестационной перестройке иммунной системы. Серьезным аргументами в пользу такого предположения являются хорошо известные данные об иммуносупрессорных свойствах другого белка данного семейства (фактора роста эндотелия сосудов А) при опухолевом росте. Иммуномодулирующие свойства PlGF изучены в значительно меньшей степени, а в отношении Т-клеток практически не исследованы. Это связано с тем, что иммуносупрессорные эффекты VEGF реализуются через рецептор к VEGF 2-го типа, а PlGF является селективным лигандом к рецептору VEGF 1-го типа, рассматриваемому в большей степени как рецептор ловушка, и экспрессия данного рецептора на Т-клетках остается дискуссионным вопросом. Тем не менее, выявленная способность PlGF при взаимодействии со своим рецептором влиять на функции дендритных клеток продемонстрировала функциональность VEGF рецептора 1-го типа. С этих позиций изучение эффектов PlGF на Т-клетки представляется несомненно актуальным, поскольку предоставляет уникальную возможность оценить роль рецептора VEGF 1-го типа в регуляции Т-лимфоцитов. Кроме того, сравнительное исследование Т-клеток при нормальной беременности и преэклампсии, т.е. состояниях, существенно различающихся по уровню PlGF, может способствовать раскрытию новых механизмов, посредством которых фетальный аллотрансплантат уклоняется от разрушительного действия иммунной системы матери при беременности.

Научная новизна исследования

Научная новизна исследования заключается в выявлении и характеристике иммуномодулирующих эффектов PlGF на Т-клетки *in vitro*. Впервые показано, что PlGF в широком диапазоне доз подавляет пролиферацию в культурах aCD3-стимулированных моноклеарных клеток, ингибируя как CD4, так CD8 Т-лимфоциты. Установлено, что ингибирующее действие фактора на пролиферацию Т-клеток является прямым и опосредуется через связывание с рецептором к VEGF 1-го типа. Также показано, что PlGF усиливает секрецию IL-10 в субпопуляциях CD4 и CD8 Т-лимфоцитов и апоптоз CD8 Т-клеток. Впервые продемонстрировано, что присутствие в культуре aCD3-

стимулированных моноклеарных клеток PlGF сопровождается усилением экспрессии ингибиторных рецепторов (PD-1, CTLA-4- и Tim-3) на CD4 и CD8 Т-лимфоцитах. Анализ экспрессии ингибиторных рецепторов на Т-клетках беременных показал, что при неосложненной гестации, характеризующейся высоким содержанием PlGF в сыворотке крови, Т-клетки характеризуются повышенной экспрессией PD-1 и Tim-3 в сравнении с фертильными небеременными. При этом впервые продемонстрирована сопряженность между концентрацией PlGF и экспрессией ингибиторных рецепторов на Т-клетках беременных. Установлено, что относительное содержание периферических CD8+PD-1+ и CD4+Tim-3+ клеток у женщин во второй половине гестации прямо коррелирует с концентрацией PlGF, и доля этих клеток в группе беременных с неосложненной гестацией (с высоким уровнем PlGF) достоверно выше, чем у беременных с преэклампсией (с низким уровнем фактора).

Научно-практическая значимость исследований

Теоретическая значимость результатов исследования Сметаненко Екатерины Александровны заключается в установлении нового механизма регуляции Т-клеток, осуществляемого PlGF и роли PlGF/VEGFR-1 сигнального пути в регуляции функций активированных Т-лимфоцитов. Кроме того, полученные в работе данные о сопряженности между экспрессией Т-клетками PD-1 и Tim-3 и уровнем PlGF расширяют представления о механизмах иммуносупрессии, опосредованной ангиогенными факторами, и являются аргументом в пользу вовлечения PlGF в перестройку иммунной системы при гестации. Обнаруженные особенности в экспрессии ингибиторных рецепторов на периферических Т-клетках беременных с сопутствующей экстрагенитальной патологией указывают на то, перестройка иммунной системы при гестации зависит от коморбидного статуса. В свою очередь, различия в экспрессии ингибиторных рецепторов в зависимости от тяжести и сроков манифестации преэклампсии являются подтверждением вовлеченности иммунных механизмов в патогенез данной патологии и иммунопатогенетической разнородности ранней и поздней преэклампсии.

Практическая значимость работы заключается в выявлении клинических факторов (коморбидный статус, срок гестации), которые ассоциированы с экспрессией ингибиторных рецепторов на периферических Т-клетках беременных. Кроме того, различия в экспрессии PD-1, CTLA-4- и Tim-3 при нормальной гестации и преэклампсии позволяет рассматривать указанные молекулы в качестве новых потенциальных биомаркеров иммунной адаптации и предикторов преэклампсии.

Конкретные рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации

Полученные результаты могут использоваться как основа для дальнейшей разработки и апробации методов прогнозирования преэклампсии и новых потенциальных биомаркеров иммунной адаптации при беременности.

Кроме того, материалы диссертации могут быть включены в программы преподавания иммунологии в медицинских и биологических вузах.

Достоверность и обоснованность научных положений и выводов, сформулированных в диссертации

Работа Сметаненко Е.А. является завершенным исследованием, которое выполнено на высоком научном и методическом уровне. Проведенные исследования полностью соответствуют поставленной цели и задачам диссертации и выполнены в полном объеме. Достоверность и обоснованность полученных результатов подтверждается достаточной выборкой исследования, продуманным алгоритмом и дизайном работы, использованием современных иммунологических методов, в том числе многоцветной цитофлюориметрии, комбинацией исследований *in vitro* и *ex vivo*, а также корректных методов статистической обработки.

Положения, выносимые на защиту, полностью подтверждены полученными результатами. Выводы основываются на фактическом материале и отражают суть проведенных исследований.

Основные результаты работы доложены и обсуждены на международных и российских научных форумах и представлены в 9 печатных работах, включая 5 статей в журналах, рекомендованных ВАК РФ, в том числе одну статью в журнале, индексируемом в базе Web of Science (Q1).

Автореферат полно отражает содержание диссертации. В нем изложены актуальность, цель, задачи, основные положения, выносимые на защиту, научная новизна, научно-практическая значимость, наиболее важные результаты и выводы.

Оценка содержания и завершенности диссертации

Диссертация написана в традиционном стиле и содержит «Введение», «Обзор литературы», главу «Материалы и методы», «Результаты собственных исследований», «Обсуждение», «Заключение», «Выводы» и список процитированной литературы. Объем работы составляет 128 страниц машинописного текста, включающего 22 таблицы и 9 рисунков. Список литературы содержит ссылки на 212 литературных источников, практически полностью состоит из зарубежных статей. Около 30% статей за последние 5 лет.

Цель работы сформулирована корректно, поставленные задачи соответствуют цели и изложены в 5 пунктах.

Введение содержит актуальность, научную новизну, теоретическую и практическую значимость и 2 основных положения, выносимые на защиту. Научная новизна и практическая значимость диссертационного исследования не вызывает сомнений.

Обзор литературы состоит из 3 основных разделов и содержит современные представления о фето-материнской толерантности, механизмах перестройки иммунной системы при гестации, роли ингибиторных рецепторов в реализации механизмов иммунной адаптации и особенностях экспрессии указанных рецепторов на Т-клетках при нормальной и осложненной гестации, а также биологических свойствах PlGF и его влиянии на клетки иммунной системы. Судя по данным обзора, автор хорошо ориентируется в современной литературе.

Глава «Материалы и методы» включает описание исследуемых когорт и современных методов для анализа фенотипических и функциональных свойств

исследуемых факторов и клеточных популяций. Все методы изложены подробно с описанием использованных расходных реактивов.

Глава «Результаты собственных исследований» состоит из 5 разделов, расположенных последовательно в соответствии с поставленными задачами. Эту главу можно условно разделить на 2 части: изучение иммуномодулирующих свойств PlGF *in vitro* и исследование ингибиторных молекул на Т-клетках при гестации с учетом клинико-лабораторных показателей *ex vivo*.

Первая часть посвящена анализу влияния PlGF на функциональную активность Т-клеток, включая пролиферацию, секрецию IL-10, активационный апоптоз и экспрессию ингибиторных рецепторов (PD-1, CTLA-4- и Tim-3) в субпопуляциях CD4 и CD8 Т-лимфоцитов. В этой же части автор исследует динамику экспрессии Т-клетками рецептора к PlGF и его роль в подавлении пролиферации Т-клеток.

Вторая часть главы посвящена исследованию особенностей экспрессии ингибиторных рецепторов на Т-клетках у беременных с неосложненной беременностью и преэклампсией (характеризующихся, соответственно, высоким и низким уровнем PlGF) в сравнении с фертильными небеременными. Автор проводит тщательный клинический анализ исследуемых пациенток, что позволяет наряду с основными поставленными задачами получить ряд новых данных о факторах, влияющих на экспрессию ингибиторных молекул, и особенностях экспрессии ингибиторных рецепторов в зависимости от тяжести и сроков манифестации преэклампсии.

В главе «Обсуждение» проведено обоснованное сопоставление полученных результатов с данными литературы. Раздел «Заключение» посвящен подведению краткого итога проделанной работы.

Выводы сформулированы четко и соответствуют поставленным задачам.

Диссертационная работа по своему содержанию полностью соответствует специальности 3.2.7. «Аллергология и иммунология».

В целом диссертация производит благоприятное впечатление, она оригинальна, высокотехнологична, конкретна, обладает внутренним единством, написана хорошим литературным языком. Работа достаточно хорошо иллюстрирована. Встречаются единичные опечатки и стилистические погрешности, но они не снижают значимости диссертации.

Существенных замечаний, которые могли бы повлиять на научную ценность представленной работы, нет. Хотелось порекомендовать автору для наглядности представить дизайн исследования и гипотезу регуляции PlGF Т-клеточных функций схематически в виде графических абстрактов.

При ознакомлении с диссертацией возникли следующие вопросы:

1. Вы показали экспрессию VEGFR-1 на лимфоцитах и роль PlGF/VEGFR-1 сигнального пути в регуляции функций активированных Т-лимфоцитов. На какие неангиогенные клетки еще оказывает влияние данный фактор?

2. Чем обусловлен выбор рецепторов контрольных точек (PD-1, CTLA-4- и Tim-3) на Т-клетках и какова функциональная роль исследуемых молекул?

Заключение

Официальный оппонент,
Заведующая лабораторией
клеточных технологий НИИКЭЛ филиал
ФИЦ ИЦИГ СО РАН
доктор медицинских наук



Дата 05июня 2023г.
Подпись д.м.н. Повещенко О.В. заверяю

Ученый секретарь
НИИКЭЛ – филиал ИГиГ СО РАН, к.б.н.

