ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора биологических наук, ведущего научного сотрудника лаборатории экологической иммунологии Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук – филиала Федерального государственного бюджетного учреждения науки Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук **Замориной Светланы Анатольевны** на диссертационную работу Сидлецкой Каролины Андреевны «Особенности формирования Т-хелперного иммунного ответа при хронической обструктивной болезни легких», представленную к защите в объединённый совет по защите диссертаций на соискание учёной степени кандидата наук, на соискание учёной степени доктора наук 99.0.062.02 при ДНЦ ФПД и ФГБОУ ВО Амурской ГМА Минздрава России на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 3.3.3 – Патологическая физиология (биологические науки).

Актуальность темы диссертации

На сегодняшний день хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) относится к наиболее широко распространенным бронхолегочным патологиям не только в России, но и в мире. В связи с тем, что ХОБЛ является одной из причин снижения качества жизни, инвалидизации и смертности населения, важной задачей современных исследований в области патофизиологии ХОБЛ является установление механизмов прогрессирования этой патологии.

Многочисленные исследования, проводимые в данном направлении, свидетельствуют о значительном вкладе Т-хелперных (Th) лимфоцитов в патогенез ХОБЛ. Известно, что при ХОБЛ происходит дизрегуляция баланса субпопуляций $CD4^+$-клеток, что влечет за собой срыв иммунологической толерантности и последующую хронизацию воспаления. В зависимости от того, какая именно субпопуляция Th-клеток активируется, формируется определенный тип иммунного ответа с вовлечением соответствующих

цитокинов и иммунокомпетентных клеток, который определяет характер течения воспалительного процесса.

Результаты экспериментальных исследований на моделях ряда патологий показали, что в регуляции Th иммунного ответа участвуют интерлейкин-6 (IL-6) сигналинг и сигнальные пути, опосредованные toll-подобными рецепторами (TLR). Однако, при ХОБЛ подобных исследований не проводилось. Несмотря на возросший интерес к изучению механизмов регуляции Th иммунного ответа, закономерности его развития при утяжелении течения ХОБЛ остаются слабо изученными, существует необходимость их детализации.

Учитывая все вышесказанное, диссертационная работа Сидлецкой К.А., раскрывающая механизмы формирования Th иммунного ответа при ХОБЛ, является весьма актуальной.

Научная новизна основных выводов и результатов

Научная новизна исследования соответствует критериям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук. В диссертационном исследовании Сидлецкой К.А. выделены доминирующие типы Т-хелперного иммунного ответа при ХОБЛ стабильного течения – Th1 и Th17, а также описаны профили цитокинов сыворотки крови, создающие условия для их формирования.

В диссертационной работе показано, что прогрессирование ХОБЛ связано с развитием Th17 иммунного ответа, характеризующегося активацией врожденного иммунитета. Выявлены особенности нарушения Т-регуляторного звена иммунной системы на фоне возрастания числа Th17-клеток у пациентов с ХОБЛ.

Впервые описан вклад TLR2 и TLR4 сигнальных путей в поляризацию Т-хелперного иммунного ответа при ХОБЛ. Значительный научный интерес представляет раскрытый в диссертационной работе механизм развития Th17 иммунного ответа, заключающийся в усилении экспрессии TLR2 и ингибировании синтеза TLR4 на циркулирующих $CD4^{+}$-клетках. Доказана важная роль классического IL-6 сигналинга, инициируемого в

периферических $CD4^+$-клетках, в развитии Th17 иммунного ответа при ХОБЛ.

Важное значение для клинической диагностики и лечения ХОБЛ имеет установленная автором взаимосвязь повышенного процентного содержания циркулирующих $CD4^+$-клеток, экспрессирующих IL-6R и TLR2, с низкими значениями параметров, характеризующими функциональное состояние органов дыхания (ОФВ1/ФЖЕЛ и ОФВ1) пациентов, страдающих данным заболеванием. Продемонстрирована высокая диагностическая ценность данных показателей в качестве биомаркеров утяжеления течения системного воспалительного процесса при этой патологии.

Теоретическая и практическая значимость

Результаты исследования Сидлецкой К.А. имеют высокую теоретическую и практическую значимость. В диссертационной работе установлены закономерности, расширяющие и детализирующие представления о системном воспалительном процессе при ХОБЛ.

В ходе исследования автором получены новые данные о клеточно-молекулярных механизмах развития Т-хелперного иммунного ответа при ХОБЛ, имеющие важное значение для патофизиологии и фундаментальной медицины. Выявлены особенности Т-клеточного ответа и цитокиновой регуляции, определяющие утяжеление течения ХОБЛ. Раскрыт механизм нарушения баланса между субпопуляциями Th17 и Т-регуляторных клеток и его вклад в формирование воспалительного ответа при этом заболевании. Установлена роль IL-6, TLR2 и TLR4 сигнальных каскадов в Th17-зависимом механизме прогрессирования ХОБЛ. Полученные Сидлецкой К.А. результаты могут быть использованы при изучении иммунных механизмов развития системного воспалительного процесса при ХОБЛ, включены в курсы лекций по патологической физиологии и иммунологии в высших учебных заведениях медицинского и биологического профилей.

Автором установлена взаимосвязь высокого уровня экспрессии IL-6R и TLR2 на мембране Т-хелперов периферической крови с ухудшением бронхиальной обструкции у пациентов с ХОБЛ. Значительный интерес для

прикладной медицины представляют выделенные автором пороговые значения биомаркеров прогрессирования ХОБЛ, таких как циркулирующие $CD4^+$-клетки, экспрессирующих IL-6R и TLR2, которые могут быть использованы для прогнозирования тяжести течения ХОБЛ специалистами практического здравоохранения, а также для разработки терапевтических мишеней для лечения данного заболевания.

По материалам исследования разработан новый способ прогнозирования на ранних стадиях хронической обструктивной болезни легких риска прогрессирования заболевания (Патент РФ № RU2740071 от 31.12.2020). Получено 2 свидетельства о государственной регистрации патентных продуктов РФ. Основные результаты исследования были представлены на научных мероприятиях различного уровня.

Достоверность полученных результатов. Оценка содержания диссертации, её завершённости, замечания по оформлению работы

Достоверность диссертационного исследования подтверждается грамотно выстроенным дизайном, репрезентативностью и достаточным объемом выборки, включающей пациентов с ХОБЛ и условно здоровых лиц. Соискателем проведен значительный объем исследований с применением современных иммунологических методов, сертифицированного оборудования и реактивов. Статистический анализ выполнен с применением современных методик. Работа обладает внутренним единством, содержит новые научные сведения, результаты работы подтверждены данными литературы и собственного исследования. Цель соответствует теме исследования, выводы и основные положения, выносимые на защиту, сформулированы грамотно и основаны на полученных результатах. Выводы полностью соответствуют поставленным задачам.

Результаты диссертационного исследования нашли отражение в 36 публикациях, 8 из которых опубликованы в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, из них – 4 в журналах, входящих в международные базы научного цитирования Web of Science и Scopus. Получен 1 патент РФ на изобретение и 2 свидетельства о государственной регистрации электронных

баз данных. Исследование было поддержано Российским фондом фундаментальных исследований, научный проект № 19-315-90029 (2019-2021).

Диссертация написана по общепринятому плану и состоит из введения, обзора литературы, глав «Материалы и методы», «Результаты собственных исследований», «Обсуждение результатов исследования», выводов, списка сокращений и списка литературы. Наглядный материал представлен в виде 16 рисунков и 16 таблиц. Список цитируемой литературы содержит 185 источников, в том числе 159 публикаций зарубежных авторов.

Во введении автор обосновывает актуальность диссертационного исследования, ссылаясь на важность изучения механизмов, опосредующих развитие Th иммунного ответа при ХОБЛ, и недостаточную степень разработанности данного вопроса. Сформулированы цель и задачи исследования, представлены положения, выносимые на защиту.

В первой главе описаны современные представления о патофизиологических аспектах Т-хелперного иммунного ответа при ХОБЛ. Основное внимание уделено описанию существующих данных о роли Th иммунного ответа в патогенезе ХОБЛ и особенностях сигнальных путей, вовлеченных в его формирование. Обзор литературы содержит достаточно исчерпывающий анализ современной литературы по изучаемому вопросу, что свидетельствует об эрудиции автора и глубоком знании проблемы.

Вторая глава посвящена подробному описанию материалов и методов исследования. Дана характеристика обследуемого контингента, критерии включения и исключения. Автором грамотно подобран комплекс анализируемых параметров с целью изучения закономерностей развития Th иммунного ответа при ХОБЛ. Для анализа уровней цитокинов в крови, уровня поверхностной экспрессии исследуемых рецепторов и иммунофенотипирования субпопуляций лимфоцитов были использованы современные лабораторные методы исследования, в частности проточная цитометрия и иммуноферментный анализ. В достаточной степени описаны протоколы иммунофенотипирования и функционального анализа субпопуляций Т-хелперов крови, использованные в исследовании.

Результативно использован комплекс современных иммунологических методов исследования, что позволило достичь цели и решить задачи исследования. Статистическая обработка полученных данных включала анализ с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни, корреляционный анализ Спирмена, ROC-анализ с определением пороговых значений, чувствительности и специфичности биомаркеров. Достаточный фактический материал, современные методы исследования и подобранный статистический аппарат убеждают в достоверности полученных данных и в правомерности изложенных в диссертации положений и выводов.

В третьей главе последовательно и детально изложены результаты собственных исследований Сидлецкой К.А. Выделены преобладающие типы Т-хелперного иммунного ответа у пациентов с ХОБЛ (Th1 и Th17) и показано их распределение среди пациентов с ХОБЛ разной степени тяжести, что позволило выявить основную роль Th17 иммунного ответа в прогрессирование патологии. Определены ключевые цитокины, опосредующие формирование Th1 и Th17 типов иммунного ответа. Установлено нарушение Т-клеточной иммуносупрессии при ХОБЛ, которое связано с дисбалансом Th субпопуляций. Показаны изменения экспрессии компонентов поверхностного рецепторного аппарата (IL-6, TLR2 и TLR4) Т-хелперов крови по мере утяжеления течения ХОБЛ. Результаты оценки корреляционных взаимосвязей данных показателей с цитокиновым спектром подтвердили вклад IL-6, TLR2 и TLR4 сигнальных путей в Th17-ассоциированное прогрессирование системного воспаления при ХОБЛ. Анализ позволил выделить IL-6R и TLR2 в качестве наиболее значимых показателей для оценки возможного ухудшения состояния пациентов, страдающих этим заболеванием. Результаты корреляционного и ROC-анализа убедительно показали целесообразность оценки уровней процентного содержания в периферической крови $CD4^{+}$-клеток, экспрессирующих IL-6R и TLR2, с целью прогнозирования ухудшения состояния больных ХОБЛ. Каждая подглава сопровождается таблицами и иллюстративным материалом, которые в значительной степени улучшают восприятие полученных результатов исследования.

В четвертой главе автором приведено обсуждение полученных результатов с привлечением современной отечественной и зарубежной научной литературы. Именно эта часть дает возможность убедиться в умении автора анализировать полученный материал. Глава заканчивается концептуальной схемой, которая отражает описанный патофизиологический механизм формирования Т-хелперного иммунного ответа при ХОБЛ.

Выводы соответствуют цели и задачам диссертационного исследования, логично вытекают из полученных результатов, сформулированы корректно.

Диссертация и автореферат оформлены в соответствии с современными требованиями с учетом ГОСТ Р7.0.11-2011 «Диссертация и автореферат диссертации. Структура и правила оформления», изложены грамотно и логично. Автореферат полностью соответствует содержанию диссертации. Работа Сидлецкой К.А. отвечает требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, и соответствует паспорту специальности 3.3.3. – патологическая физиология.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации

Результаты и выводы диссертации целесообразно использовать в практической деятельности терапевтического и пульмонологического профилей, а также при подготовке специалистов соответствующих специальностей.

Замечания и вопросы

1. Известно, что в Т-хелперном ответе участвуют и Т-хелперные клетки памяти ($CD4^{+}CD45R0^{+}$), но они остались за пределами данной работы. Известно ли что-то про эти клетки при ХОБЛ?
2. Известно ли, какие именно лиганды, характерные конкретно для ХОБЛ стимулируют TLR2 и TLR4 рецепторы?
3. Для определения уровня Treg были выбраны только поверхностные маркеры ($CD25^{+}$, $CD127^{-}$), но не внутриклеточный FOXP3, и это вполне приемлемо для больших исследований. Однако, существуют ли

литературные данные по уровню Treg ($CD25^+FOXP3^+CD127^-$) при ХОБЛ, подтверждающие Ваши данные о снижении количества этих клеток?

Заключение

Таким образом, диссертация Сидлецкой Каролины Андреевны «Особенности формирования Т-хелперного иммунного ответа при хронической обструктивной болезни легких» является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение задачи определения клеточно-молекулярных механизмов регуляции Т-хелперного иммунного ответа при ХОБЛ, имеющей значение для развития патологической физиологии, что соответствует требованиям к диссертациям на соискание учёной степени кандидата наук, установленным п. 9 Положения о присуждении учёных степеней, утверждённым Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842 (изменениями, внесенными Постановлениями Правительства РФ от 21.04.2016 № 335, от 01.10.2018 № 1168, от 20.03.2021 № 426), а сам автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 3.3.3 – Патологическая физиология.

Официальный оппонент:

д.б.н., в.н.с. лаборатории
экологической иммунологии
ИЭГМ УрО РАН

Заморина Светлана Анатольевна

«10» ноября 2021 г.

Адрес: 614081, г. Пермь, ул. Голева, д. 13
Тел.: (342) 280-74-42,
Эл. почта: info@iegm.ru
Сайт: iegm.ru

"ИЭГМ УрО РАН"
Подпись С.А. Заморина
заверяю
главный специалист по кадрам М.В.Корепанова

ОТДЕЛ КАДРОВ