

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора биологических наук, Хайдукова Сергея Валерьевича на диссертационную работу Пантелеева Александра Владимировича «Особенности реакций клеточного иммунитета, специфичных по отношению к антигенам микобактерий, у больных туберкулезом легких», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.03.09 - клиническая иммунология, аллергология.

Актуальность темы исследования

Туберкулез представляет собой инфекционное заболевание, в развитии которого значительная роль принадлежит иммунной системе. Первоначально считалось, что одной из причин развития туберкулеза является недостаточность иммунного ответа. Позднее была выявлена роль иммунологической гиперреактивности в развитии туберкулеза. В настоящее время принято считать, что развитие туберкулеза (ТБ) и неспособность организма хозяина обеспечить полное уничтожение патогена или поддержание латентной туберкулезной инфекции могут определяться и теми, и другими реакциями иммунной системы. В свою очередь роль количественных показателей иммунного ответа в развитии заболевания до конца не выяснена.

Существующие представления об особенностях развития протективного иммунного ответа в патогенезе туберкулеза основаны в значительной степени на результатах, полученных в экспериментальных моделях на мышах. Однако у человека развитие туберкулезной инфекции имеет свои особенности. Исследования, построенные на оценке ограниченного количества параметров иммунного ответа у больных ТБ и людей с латентной туберкулезной инфекцией, в большинстве случаев не учитывают разнообразие клинических особенностей болезни. Вместе с тем ТБ является заболеванием, характеризующимся большим разнообразием форм и особенностей состояния патогена.

До настоящего времени недостаточно исследован характер взаимосвязи между различными параметрами иммунного ответа и конкретными клиническими проявлениями ТБ. Помимо этого, неясными остаются иммунологические корреляции между протекцией и прогрессированием ТБ, активностью туберкулезной инфекции, а также параметры, позволяющие дифференцировать активный туберкулез и латентную туберкулезную инфекцию.

Таким образом, тема диссертационной работы Пантелеева А.В., посвященная

изучению особенностей реакций клеточного иммунитета у больных туберкулезом легких и анализу взаимосвязи между особенностями течения инфекционного процесса у больных ТБ легких и количественными параметрами ответа Th1 лимфоцитов и клеток врожденного иммунитета является актуальной для понимания иммунопатогенеза туберкулеза.

Степень новизны, обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

В диссертационной работе Пантелеева А.В. была предложена новая стратегия анализа иммунного ответа при ТБ. Было предложено выделять отдельные показатели тяжести туберкулезного процесса (распространённость поражения легочной ткани, степень деструкции легочной ткани, клиническую тяжесть заболевания, клинические формы туберкулеза и наличие микобактерий туберкулеза или их ДНК), оценить выраженность каждого из них и анализировать взаимосвязь каждого из проявлений тяжести с иммунологическими показателями. В диссертационной работе было исследовано достаточно большое число иммунологических параметров – 53 показателя, которые характеризуют содержание антиген-специфичных популяций Th1 лимфоцитов, продуцирующих цитокины TNF- α , IFN- γ и IL-2, уровень продукции TNF- α и IFN- γ и содержание антиген-неспецифичных популяций лимфоцитов и лейкоцитов.

Выбранная стратегия позволила показать, что тяжесть проявлений ТБ связана с развитием патологических реакций, проявляющихся в изменении содержания антиген-неспецифичных популяций лейкоцитов (увеличении содержания палочкоядерных нейтрофилов и снижении содержания общей популяции лимфоцитов). При этом исследованные показатели антиген-специфичного ответа у больных туберкулезом не супрессированы и не влияют на тяжесть проявлений туберкулеза. В работе также показано, что Th1 лимфоциты у больных ТБ легких, продуцирующие цитокины TNF- α , IFN- γ и IL-2 в различных комбинациях, характеризовались различной степенью дифференцировки и различной экспрессией PD-1. В частности, субпопуляция Th1 лимфоцитов, продуцирующая TNF- α и IFN- γ и не продуцирующая IL-2, преобладала среди других субпопуляций Th1 клеток у больных ТБ и содержала наибольший процент высокодифференцированных лимфоцитов и наименьшее количество клеток, экспрессирующих PD-1.

Кроме этого, впервые была одновременно оценена диагностическая ценность

нескольких способов выявления активности туберкулезного процесса, основанных на определении содержания или степени дифференцировки антиген-специфичных Th1 лимфоцитов. Показано, что два из них обладали наибольшей чувствительностью и специфичностью. В первом оценивали степень дифференцировки антиген-специфичных лимфоцитов, продуцирующих TNF- α и/или IFN- γ (чувствительность - 79%, специфичность - 78%), во втором - содержание антиген-специфичных лимфоцитов, ко-продуцирующих TNF- α и IFN- γ и не продуцирующих IL-2 (чувствительность - 79%, специфичность - 72%).

Теоретическая и практическая значимость работы

Результаты, представленные в данной работе, имеют фундаментальное значение для иммунологии туберкулеза и представляют практический интерес. Взаимосвязь содержания различных популяций иммунокомпетентных клеток и особенностей течения туберкулезного процесса выявило то, что роль количественных показателей антиген-специфического ответа Th1 лимфоцитов на ранних этапах развития туберкулеза является незначительной. Однако увеличение содержания палочкоядерных нейтрофилов и уменьшение содержания лимфоцитов (антиген-неспецифичных клеточных популяций), выявило высокую ассоциацию со степенью деструкции легочной ткани. Таким образом, Пантелеев А.В. в своей работе выделяет реакции иммунного ответа, которые определяют тяжесть туберкулезного процесса и служат потенциальными мишенями для персонализированной терапии. В целом, выводы, полученные в данной работе расширяют представления о иммунопатогенезе ТБ.

Практическая значимость работы состоит в определении информативности существующих способов дифференциальной диагностики туберкулеза и латентной туберкулезной инфекции с использованием антиген-специфичных лимфоцитов периферической крови, а способ, связанный с оценкой степени дифференцировки антиген-специфичных лимфоцитов, продуцирующих TNF- α и/или IFN- γ , может быть рекомендован к применению.

Достоверность и апробация результатов исследования

Достоверность результатов диссертационного исследования определяется использованием современных иммунологических методов, таких как проточная цитометрия, ИФА и мультиплексный анализ и адекватного статистического анализа полученных данных. Методы статистического анализа, использованные в работе,

включали непараметрический тест Крускала-Уоллиса с поправкой на множественные сравнения Бенджамина-Хохберга, метод создания псевдовыборок, корреляционный анализ по Спирмену с поправкой на множественные сравнения Бенджамина-Хохберга, метод минимальных моделей и ROC-анализ для определения чувствительности и специфичности иммунологических способов определения активности ТБ.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту, сформулированы автором и научно обоснованы, выводы исследования логично проистекают из полученных результатов. Пантелеевым А.В. в ходе выполнения диссертационного исследования опубликовано 12 печатных работ, в том числе – 5 в рецензируемых журналах, входящих в базы данных Web of Science и Scopus, что является достаточным по требованиям, предъявляемым ВАК к диссертациям, предъявляемым на соискание учёной степени кандидата наук.

Апробация работы состоялась на научной конференции отдела иммунологии ФГБНУ «ЦНИИТ» 26 июня 2017 года (протокол №1), результаты работы были обсуждены и доложены на 8 Российских и международных научных конференциях.

Оценка содержания, завершенности и оформления диссертации

Диссертационная работа Пантелеева А.В. написана в традиционном стиле и изложена хорошим литературным языком. Объем работы составляет 110 страниц машинописного текста и имеет следующие разделы: введение, обзор литературы, 4 главы собственных исследований, обсуждение результатов, заключение, выводы, практические рекомендации, перспективы дальнейшей разработки темы, список сокращений и список литературных источников.

Введение. Во введении автор обосновывает актуальность исследования, в том числе, приводит описание разработанности темы, указывает научную новизну, теоретическую и практическую значимость исследования и приводит основные положения, выносимые на защиту, описывает методологию и методы исследования.

Глава I. Обзор литературы. Обзор литературы состоит из 6 подразделов, описывающих историю вопроса иммунологических исследований в области ТБ, особенно протективную роль Th1 лимфоцитов и современные представления о их возможном вкладе в патологию при экспериментальной туберкулезной инфекции.

Глава II. Материалы и методы исследования. Во второй главе изложены использованные в работе методы исследования – проточная цитометрия, ИФА и

мультиплексный анализ. Основным методом данного исследования являлась проточная цитометрия. Соискатель подробно описал способ стимуляции лимфоцитов крови, детали пробоподготовки, а также стратегию выделения основных популяций лимфоцитов, антиген-реактивных Th1 лимфоцитов и различных функциональных Th1 субпопуляций путем введения логических ограничений в протоколы исследования.

Глава III. Результаты собственных исследований. Данная глава состоит из 4 подглав. В первой приведено описание ранговой системы, использованной для характеристики показателей тяжести туберкулеза у больных. Описаны результаты корреляционного и кластерного анализа показателей тяжести туберкулеза. Вторая подглава посвящена анализу антиген-специфичного ответа Th1 лимфоцитов у больных ТБ и условно здоровых индивидов. В данной подглаве описаны результаты оценки следующих показателей: относительное и абсолютное количество лимфоцитов, продуцирующих TNF- α , IFN- γ и IL-2, по отдельности и в различных комбинациях, уровень антиген-индуцированной продукции IFN- γ и уровень спонтанной продукции TNF- α . При анализе этих показателей показано, что уровень продукции и содержание цитокинов было выше у больных туберкулезом, по сравнению с условно здоровыми индивидами. При анализе Th1 субпопуляций, отличающихся по различной степени продукции цитокинов TNF- α , IFN- γ и IL-2, было выявлено, что у больных туберкулезом, по сравнению с условно здоровыми индивидами, преобладают лимфоциты, ко-продуцирующие TNF- α и IFN- γ и не продуцирующие IL-2. В третьей подглаве приведена характеристика Th1 субпопуляций у больных туберкулезом легких на основании их степени дифференцировки и относительного количества PD-1 позитивных клеток. Популяция лимфоцитов, преобладающая у больных туберкулезом (TNF- α^+ IFN- γ^+ IL-2 $^-$) характеризовалась наибольшей степенью дифференцировки и наименьшим процентом PD-1 позитивных клеток. В четвертой подглаве проведен многопараметрический корреляционный анализ всех проанализированных показателей тяжести туберкулеза и исследованных иммунологических показателей. В ходе анализа определены основные иммунологические корреляты тяжелого течения ТБ. Для степени деструкции легочной ткани и степени бактериовыделения этими иммунологическими показателями стало увеличение содержания палочкоядерных нейтрофилов, а для клинической тяжести заболевания - снижение содержания лимфоцитов.

Глава **Обсуждение** посвящена анализу собственных данных соискателя, полученных в ходе исследования, в сопоставлении с данными литературы.

Выводы диссертации сформулированы четко, научно обоснованы и аргументированы, логически вытекают из поставленной цели и задач исследования.

Соответствие специальности. Диссертация написана хорошим научным языком с большим количеством иллюстративного и табличного материала. Содержание работы соответствует формуле специальности 14.03.09 - клиническая иммунология, аллергология и области исследования биологические науки, а именно: изучению патогенеза иммунозависимых заболеваний и созданию методов диагностики заболеваний, связанных с нарушениями в системе иммунитета. Основные положения и выводы диссертации сформулированы в автореферате и приведены в опубликованных работах.

Замечания по диссертационной работе в целом

В процессе ознакомления с диссертационной работой Пантелеева А.В. возникли следующие замечания и вопросы: в отдельных местах антиген PD-1 написан как PD1, что по-видимому связано с опечаткой; вместо «здоровые участники исследования» следовало применять термин «условно здоровые индивиды».

1. Оценивалось ли количество активированных NK ($CD3^+CD8^+$) и NKT лимфоцитов ($CD3^+CD16^+CD56^+$)?

2. Считает ли автор, что иммунологические методы оценки активности туберкулезного процесса могут быть предложены в качестве альтернативы молекулярно-биологическим и лучевым методам диагностики?

Заключение

Диссертационная работа Пантелеева Александра Владимировича на тему «Исследование особенностей реакций клеточного иммунитета, специфичных по отношению к антигенам микобактерий, у больных туберкулезом легких» является законченной научно-квалификационной работой, содержащей новое решение актуальной научной задачи – детальный анализ иммунологических параметров и показателей тяжести туберкулеза с оценкой существования взаимосвязей между ними, имеющей существенное значение для иммунологии. По актуальности, научной новизне и практической значимости результатов, объему проведенных исследований диссертационная работа соответствует требованиям п. 9 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства

Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года (с изменениями Постановлений Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 года № 335, от 02 августа 2016 года № 748, от 29 мая 2017 года № 650, от 28 августа 2017 года № 1024 «О внесении изменений в Положение о присуждении ученых степеней»), предъявляемым к диссертационным работам на соискание ученой степени кандидата наук, а её автор, Пантелеев Александр Владимирович, заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.03.09 - клиническая иммунология, аллергология.

Официальный оппонент,
старший научный сотрудник отдела «Химической биологии гликанов и липидов»
Федерального Государственного Бюджетного Учреждения Науки Институт
биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук,
доктор биологических наук (14.03.09 - клиническая иммунология, аллергология;
14.03.10 – клиническая лабораторная диагностика),

Хайдуков Сергей Валерьевич

117997, Москва, ГСП-7, улица Миклухо-Маклая, дом 16/10
Телефон: +7 (495) 335-01-00; Факс: +7 (495) 335-08-12;
Эл. почта: khsergey54@mail.ru

Подпись доктора биологических наук Хайдукова Сергея Валерьевича заверяю:

Ученый секретарь ФГБУН Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук,
доктор физико-математических наук



В. А. Олейников

11 мая 2018 года