

## ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора медицинских наук, профессора Пинегина Бориса Владимировича на диссертационную работу Ворониной Елены Викторовны «Созревание Т-фолликулярных хелперов в моделях *in vitro* и при *Helicobacter pylori*-инфекции *in vivo*» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.03.09 – «Клиническая иммунология, аллергология».

### Актуальность темы исследования

Представленная диссертационная работа Ворониной Е.В. посвящена изучению созревания Т-фолликулярных хелперов в экспериментальных моделях *in vitro* и при *Helicobacter pylori*-инфекции *in vivo*. Изучение этапов созревания иммунных клеток, процессов, приводящих к узкой специализации, и, следовательно, приобретению уникальных физиологических функций, является актуальной научной задачей современной иммунологии.

Несмотря на то, что физиологическая роль Т-фолликулярных хелперов, как основных стимуляторов гуморального иммунного ответа, подробно исследована, процесс их дифференцировки в норме и при различных инфекционных заболеваниях изучен недостаточно. По литературным данным, созревание Т-фолликулярных хелперов является многостадийным процессом. Как и в случае созревания других субпопуляций Т-хелперов, созревание Т-фолликулярных хелперов запускается взаимодействием наивных Т-хелперов с дендритными клетками в Т-клеточной зоне лимфатического узла. После активации Т-клеток, на части из них экспрессируется хемокиновый рецептор CXCR5, служащий инструментом хоминга в область В-клеточных фолликулов вторичных лимфоидных органов. Мигрируя в зону локализации В-лимфоцитов, Т-хелперы проходят заключительные этапы созревания в Т-фолликулярные хелперы, получая необходимые сигналы от В-лимфоцитов.

В то же время, имеются данные, свидетельствующие о том, что В-лимфоциты могут являться основными антиген-презентирующими

клетками, индуцирующими дифференцировку Т-фолликулярных хелперов. Такая возможность созревания Т-фолликулярных хелперов была показана для частично дифференцированных центральных Т-клеток памяти. Однако не исследованной является возможность созревания Т-фолликулярных хелперов из наивных  $CD4^+$  Т-лимфоцитов при направленной миграции в область В-клеточных фолликулов и непосредственном взаимодействии с В-лимфоцитами, без предварительного контакта с дендритными клетками в Т-клеточной зоне лимфатического узла. В связи с этим, научный интерес представляет исследование вклада различных антиген-презентирующих клеток в процесс созревания Т-фолликулярных хелперов.

Несмотря на то, что основная функция Т-фолликулярных хелперов заключается в индукции гуморального иммунного ответа, при некоторых заболеваниях, в частности, при *H. pylori*-инфекции, Т-фолликулярные хелперы могут принимать участие в клеточных иммунных реакциях, а их секреторная активность может приводить к развитию воспаления. По этой причине, весьма актуальным в плане исследования патогенеза заболеваний, ассоциированных с *H. pylori*-инфекцией, является изучение созревания Т-фолликулярных хелперов при данной патологии.

#### **Степени новизны, обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации**

В результате исследований, изложенных в представленной диссертационной работе, было впервые показано, что часть наивных рециркулирующих  $CD3^+CD4^+CD45RA^+CD45RO^-$  Т-хелперов экспрессирует набор хемокиновых рецепторов, необходимый для миграции этих клеток как в Т-клеточную, так и в В-клеточную зону вторичных лимфоидных органов.

Впервые показано, что при совместном культивировании Т-хелперов и дендритных клеток, Т-хелперы приобретают фенотип  $CD4^+CD45RO^+CCR7^-CXCR5^-$ , свойственный Т-клеткам эффекторам или эффекторным Т-клеткам памяти. В смешанных культурах Т-хелперов и дендритных клеток не

происходит созревания Т-хелперов с фенотипом, характерным для Т-фолликулярных хелперов.

Впервые показано, что в смешанных культурах В-лимфоцитов и CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, наиболее многочисленная группа созревающих Т-клеток демонстрирует типичный фенотип Т-фолликулярных хелперов: CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>Bcl-6<sup>+</sup>. Впервые выявлены фенотипические изменения В-лимфоцитов, созревающих в смешанных культурах с Т-хелперами. В-лимфоциты смешанных культур с Т-хелперами экспрессировали ядерный фактор транскрипции Bcl-6 и снижали экспрессию IgM.

Впервые установлено, что при язвенной болезни, ассоциированной с *H. pylori*-инфекцией происходит увеличение содержания CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup> Т-хелперов.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Теоретическая значимость работы определяется полученными данными о процессе созревания Т-фолликулярных хелперов в норме и при *H. pylori*-инфекции. В результате выполнения диссертационной работы было показано, что часть наивных Т-хелперов имеет возможность прямой миграции в В-клеточные зоны вторичных лимфоидных органов. В экспериментальных моделях клеточных взаимодействий в условиях *in vitro* было показано, что созревание Т-фолликулярных хелперов происходило при прямом контакте с В-лимфоцитами, без предварительного взаимодействия с дендритными клетками. Полученные данные значительно расширяют существующие на данный момент представления о механизмах индукции гуморального иммунного ответа.

В процессе выполнения диссертации были разработаны исследовательские модели смешанных культур для изучения индуктивной фазы Т-зависимого гуморального иммунного ответа. Разработанные автором модели имеют большую практическую значимость: они могут быть

использованы в клеточной иммунологии, иммунофармакологии и иммунитоксикологии для изучения молекулярных механизмов, лежащих в основе процессов межклеточных взаимодействий при реализации гуморального иммунного ответа, что может быть использовано для разработки новых методов направленной терапии.

Полученные диссертантом сведения об изменениях субпопуляционного состава Т-хелперов при заболеваниях, ассоциированных с H. pylori-инфекцией, могут найти применение в клинической иммунологии для диагностических целей.

### **Достоверность и апробация результатов исследования, в том числе публикации в рецензируемых изданиях**

Достоверность результатов обеспечивает большой объем проделанной работы, выполненной на современном уровне, с применением высокотехнологичных методов исследования. Результаты диссертационной работы были изложены в 6 статьях рецензируемых изданий списка ВАК. Апробация диссертации была проведена на заседании Ученого Совета ФБУН ННИИЭМ имени академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора. Результаты диссертации были доложены на областных и всероссийских научных конференциях.

### **Оценка содержания, завершенности и оформления диссертации**

Диссертация изложена традиционным способом на 168 страницах машинописного текста. Работа включает в себя следующие разделы и главы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты исследования, обсуждение, заключение, выводы, практические рекомендации, перспективы дальнейшей разработки темы. Диссертация содержит 31 рисунок и 6 таблиц. Список литературы включает в себя 4 отечественных источника и 346 зарубежных источников.

Во «Введении» соискатель освещает актуальность работы и степень ее разработанности, цель и задачи работы, теоретическую и практическую значимость диссертации, положения, выносимые на защиту.

Глава «Обзор литературы» содержит подробную характеристику субпопуляционного состава Т-хелперов, освещает существующие в литературе данные о процессе созревания Т-фолликулярных хелперов, о зоне локализации данных клеток в организме, приводит характеристику функционально значимых молекул для изучаемой группы клеток.

Глава «Материалы и методы» описывает общую схему исследований, выделение наивных Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов, дендритных клеток, создание смешанных культур *in vitro*. Приведена методика поверхностного и внутриклеточного флуоресцентного окрашивания искомым молекул, методика определения исследуемых молекул методом проточной цитофлуориметрии, определение экспрессии генов ядерных факторов транскрипции методом ОТ-ПЦР. Описана методика исследования фенотипа Т-хелперов при заболеваниях, ассоциированных с *H. pylori*-инфекцией.

Глава «Результаты исследований» включает в себя основные результаты диссертационной работы. Автором показано, что часть наивных  $CD4^+CD45RA^+CD45RO^-$  Т-лимфоцитов периферической крови человека экспрессирует хемокиновый рецептор CXCR5, необходимый для миграции в В-клеточные зоны вторичных лимфоидных органов. Основной раздел главы «Результаты исследования» посвящен исследованию созревания Т-фолликулярных хелперов в смешанных культурах с антиген-презентирующими клетками. Воронина Е.В. приводит характеристику Т-лимфоцитов смешанных культур в зависимости от наличия экспрессии хемокиновых рецепторов CCR7, CXCR5 и других функционально значимых для Т-хелперов молекул, а также экспрессии ядерного фактора транскрипции Bcl-6, управляющего созреванием Т-фолликулярных хелперов. Показано, что в смешанных культурах с В-лимфоцитами происходило созревание Т-клеток с фенотипом, характерным для Т-фолликулярных хелперов. В то же время,

при культивировании Т-лимфоцитов с дендритными клетками большая часть Т-клеток преимущественно характеризовалась фенотипом Т-клеток эффекторов или эффекторных Т-клеток памяти. В смешанных культурах Т-хелперов и дендритных клеток практически не происходило созревания Т-лимфоцитов с фенотипом Т-фолликулярных хелперов. Кроме того, было показано, что совместное культивирование В-лимфоцитов и Т-хелперов способствовало созреванию В-лимфоцитов и формированию фенотипа CXCR5<sup>+</sup> В-клеток, способных к переключению изотипов иммуноглобулинов. Также показано, что при язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки, ассоциированных с *H. pylori*-инфекцией, было выявлено увеличение недавно активированных зрелых Т-хелперов, зрелых Т-фолликулярных хелперов и зрелых CCR6<sup>+</sup> Т-хелперов. При гастродуодените, ассоциированном с *H. pylori*-инфекцией, было выявлено увеличение группы незрелых CXCR5<sup>+</sup> Т-хелперов. Представленные результаты диссертационной работы получены на основе значительного количества исследований с применением современных методик и обработаны с помощью адекватных статистических методов.

В главе «Обсуждение» анализируются результаты, полученные в ходе выполнения диссертационной работы. На основе полученных данных выдвигается гипотеза об альтернативном механизме созревания Т-фолликулярных хелперов без участия дендритных клеток. По предположению автора, при реализации этого пути созревания основными антиген-презентирующими клетками для наивных Т-хелперов выступают В-лимфоциты, а весь процесс созревания Т-фолликулярных хелперов локализован в В-клеточных зонах вторичных лимфоидных органов.

Основные положения диссертационной работы кратко резюмированы и приведены автором в разделе «Заключение».

В заключительной части диссертации Воронина Е.В. приводит выводы, логически вытекающие из поставленных задач, практические рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы.

В автореферате отражены основные результаты и положения диссертационной работы, корректно и лаконично сформулированы основные выводы, адекватно отражающие результаты проделанной научной работы.

Принципиальных замечаний к диссертационной работе нет. Стилистические погрешности, орфографические и пунктуационные опечатки не влияют на качество диссертационной работы.

### **Соответствие специальности**

Кандидатская диссертация Ворониной Е.В. полностью соответствует специальности, по которой предоставляется к защите – 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология.

### **Заключение**

Таким образом, диссертационная работа Ворониной Елены Викторовны на тему «Созревание Т-фолликулярных хелперов в моделях *in vitro* и при *Helicobacter pylori*-инфекции *in vivo*» является законченной научно-квалификационной работой, выполненной под руководством доктора медицинских наук, профессора Талаева Владимира Юрьевича, содержащей новое решение актуальной научной задачи – изучена индуктивная фаза Т-зависимого гуморального иммунного ответа и получены новые данные о субпопуляционном составе Т-хелперов при заболеваниях, ассоциированных с *H. pylori*-инфекцией, имеющей существенное значение для клинической иммунологии, аллергологии.

Диссертационная работа Ворониной Елены Викторовны на тему «Созревание Т-фолликулярных хелперов в моделях *in vitro* и при *Helicobacter pylori*-инфекции *in vivo*», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология, по актуальности, научной новизне и практической значимости результатов, объему проведенных исследований соответствует требованиям п. 9 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской

Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года (с изменениями в соответствии с Постановлением Правительства Российской Федерации № 335 от 21 апреля 2016 года, № 748 от 2 августа 2016 года, № 650 от 29 мая 2017 года, № 1024 от 28 августа 2017 года «О внесении изменений в Положение о присуждении ученых степеней»), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор – Воронина Елена Викторовна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология.

**Официальный оппонент:**

заведующий отделом иммунодиагностики и иммунокоррекции  
Федерального государственного бюджетного учреждения  
«Государственный научный центр «Институт иммунологии»  
Федерального медико-биологического агентства,  
доктор медицинских наук, профессор

**Пинегин Борис Владимирович**

115478, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24,  
тел.: +7 (499) 311-67-78, e-mail: info@nrcii.ru

Дата: «23» апреля 2019 года

