

ОТЗЫВ

официального оппонента, Колесниковой Натальи Владиславовны, доктора биологических наук, профессора, профессора кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики факультета повышения квалификации и профессиональной переподготовки специалистов ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации на диссертационную работу Шардиной Ксении Юрьевны «Роль фетоплацентарных белков в регуляции дифференцировки и функциональной активности миелоидных супрессорных клеток», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 3.2.7. Иммунология

Актуальность темы исследования. Миелоидные супрессорные клетки (MDSC), представляющие собой незрелые клетки миелоидного происхождения с иммунофенотипом $CD11b^+CD33^+HLA-DR^{low}$, привлекают к себе внимание многих исследователей как многообещающие биомаркеры и мишени для новых терапевтических стратегий с позиций блокирования развития, дифференцировки, истощения и дезактивации клеток при апластических, аутоиммунных, инфекционных и воспалительных заболеваниях, а также при беременности, ожирении и отторжении трансплантата. Известны также иммуномодулирующие свойства MDSC, позволяющие повышать образование Т-регуляторных клеток с супрессорной активностью (Treg), снижать пролиферацию Т-лимфоцитов и функциональную активность лимфоцитов-киллеров врожденного иммунитета (NK), а также участвовать в M2-поляризации макрофагов. Однако исследование MDSC пока не является рутинной практикой в клинических лабораториях, что обусловлено необходимостью более углубленного изучения механизмов регуляции их функциональности, которое будет способствовать их потенциальному использованию в качестве биомаркеров тяжести заболевания, эффективности традиционной терапии и прогноза заболеваний, а также в качестве возможных терапевтических инструментов в будущем. Одним из перспективных направлений в расширении представлений о биологии MDSC может быть дальнейшее исследование их взаимоотношений с различными фетоплацентарными белками, что базируется на известных данных об их участии (как и MDSC) в ограничении иммунного ответа материнского организма на эмбриональные антигены с индукцией иммунологической

толерантности при гестационном процессе. Именно поэтому диссертационное исследование Шардиной К.Ю., направленное на оценку роли фетоплацентарных белков в регуляции дифференцировки и функциональной активности миелоидных супрессорных клеток, является актуальным.

Степень обоснованности и достоверность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. Представленное исследование проведено на высоком научном и методическом уровнях. Достоверность полученных результатов подтверждается тем, что выводы, сделанные в диссертации, являются результатом анализа большого количества экспериментальных данных, которые были статистически обработаны с использованием непараметрического варианта дисперсионного анализа (критерий Фридмана), в ряде случаев – с расчетом коэффициента корреляции Спирмена, и с поправкой Бонферрони, использованной для решения проблемы множественных сравнений. Научные выводы вытекают непосредственно из экспериментальных данных, обоснованы и в полной мере отражают результаты.

Достоверность и новизна полученных результатов. Новизна диссертационной работы К.Ю. Шардиной, прежде всего, подтверждается использованием новой двухэтапной стратегии генерации MDSC и разработкой собственных протоколов получения MDSC из CD33⁺ - и CD11b⁺-клеток периферической крови здорового человека при помощи направленной цитокиновой индукции и результатами впервые изученного характера влияния альфа-фетопротейна, гликоделина и хорионического гонадотропина на дифференцировку общего пула MDSC и его субпопуляций (M-MDSC и PMN-MDSC), а также на их функции посредством оценки внутриклеточной экспрессии аргиназы-1 и индоламин-2,3-диоксигеназы. В диссертационной работе установлено, что альфа-фетопротейн, гликоделин и хорионический гонадотропин человека регулируют уровень моноцитарных и полиморфноядерных MDSC, а также продукцию этими клетками широкого спектра цитокинов и ферментов ИДО и Arg 1.

Значимость для науки и практики результатов диссертации.

Результаты исследования характера влияния фетоплацентарных белков на иммуносупрессорную функцию MDSC существенно расширяют современные представления о роли последних в индукции феномена иммунологической толерантности при беременности и отражают наличие их функциональной связи с белками фетоплацентарного комплекса, что свидетельствует о теоретической значимости проведенных исследований. Наряду с этим результаты диссертационного исследования К.Ю. Шадринной имеют практическую значимость, обусловленную разработкой собственных протоколов получения MDSC из CD33+ - и CD11b+ -клеток периферической крови здорового человека при помощи направленной цитокиновой индукции, которые могут быть использованы в дальнейшей научно-исследовательской работе, а также обоснованием потенциальной возможности использования альфа-фетопротеина, гликоделина и хорионического гонадотропина в качестве иммунофармакологических препаратов, а использование MDSC – в клеточной терапии. По теме диссертации опубликовано 15 научных работ, в том числе в изданиях, рекомендованных ВАК – 6 статей, индексируемых в МБД: WoS и Scopus – 7, РИНЦ-2.

Оценка содержания диссертации. Диссертационная работа изложена на 120 страницах, содержит 14 рисунков и 5 таблиц. Текст диссертации содержит введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, результаты собственных исследований, обсуждение результатов исследования, выводы, список сокращений и список литературы, а также приложения. Во *Введении* обоснован выбор темы диссертационной работы, четко описана новизна, поставлены цель и задачи исследования, а также сформулированы положения, выносимые на защиту. *Обзор литературы* представляет собой глубокий и компетентный анализ 190 современных научных работ, посвященных происхождению, биологическим свойствам и известным функциям иммуносупрессивной популяции MDSC, который не только обосновывает необходимость проведенных исследований, но и демонстрирует способности автора к научному критическому анализу, к обобщению и систематизации данных мировой литературы.

В главе 2 «Материалы и методы» описаны методы исследования, позволившие Шардиной К.Ю. разработать модели генерации MDSC и оценить влияние на них основных белков фетоплацентарного комплекса. При этом принцип генерации популяций MDSC включал в себя направленную цитокин-опосредованную индукцию в соответствии с CD33⁺- и CD11b⁺- экспрессией сепарированных клеток периферической крови с оценкой иммунофенотипа культуры клеток методом проточной цитофлуориметрии, тогда как для определения уровней клеточных ферментов (аргиназы-1 и индоламин-2,3-диоксигеназы) применяли сложный метод пермеабиллизации клеточной мембраны. Наряду с этим автором использован мультиплексный анализ внутрительного профиля цитокинов (IL-27, IL-2, IL-8, IL-12, IL-12, IL-20, IL-26, IL-27, IL-28A/IFN- λ 2, IL-32, IL-34, LIGHT/TNFSF14, TSLP, TWEAK/TNFSF12, IL-22, IL-10, IL-11, IL-19, IL-35, Pentraxin-3, Chitinase-3-like 1/APRIL/TNFSF13, BAFF/TNFSF13B, sTNF-R1, sTNF-R2, sCD30/TNFRS8, MMP-1, MMP-2, MMP-3, sCD163, gp 130/sIL6R β , sIL-6R α , Osteocalcin, osteopontin, IFN- α 2, IFN- β , IFN- γ) по технологии Luminex xMAP®, что, в целом, свидетельствует о весьма современном методическом уровне проводимых исследований и достоверности полученных результатов. В главе 3 подробно представлены результаты собственного исследования, которые сопровождаются таблицами и рисунками. Описаны два протокола дифференцировки MDSC из CD33⁺- и CD11b⁺-клеток, отражены результаты влияния белков беременности на дифференцировку и функциональную активность MDSC. Клеточная дифференцировка была оценена с помощью иммунофенотипирования, а функциональная активность – путем внутриклеточного измерения ферментов (Арг 1 и ИДО) и мультиплексного анализа цитокинового профиля. В *Заключении* изложены и обсуждены основные результаты проведенных исследований, в частности, описаны условия дифференцировки популяций супрессорных клеток *in vitro*, определены различия в характере влияния альфа-фетопротеина, хорионического гонадотропина и гликоделина на фенотипическую дифференцировку CD33⁺- и CD11b⁺-клеток в MDSC, а также обнаружена способность гликоделина усиливать внутриклеточную экспрессию индоламин-2,3-диоксигеназы, но не аргиназы-1 в MDSC, что автор связывает

неподходящими условиями культивирования для ее генерации. Наряду с этим продемонстрированы эффекты влияния гликоделина на уровень продукции IL-20 в культуре CD33⁺-клеток, индуцированных в MDSC, а также гликоделина и альфа-фетопротеина на продукцию IFN α 2, IL-26, IL-19 и TWEAK/TNFsF12 в культуре CD11b⁺-клеток, индуцированных к дифференцировке в MDSC, с обсуждением возможных причин наблюдаемого характера изменений. *Выводы* диссертации четко сформулированы, вытекают из результатов исследований автора и соответствуют поставленным задачам.

Рекомендации по использованию данных и выводов диссертации.

Данные исследования включены в курс «Иммунология» кафедры микробиологии и иммунологии Пермского государственного национального исследовательского университета, а также в научные исследования, касающиеся изучения миелоидных супрессорных клеток, Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН. Разработанные Шардиной К.Ю. протоколы получения MDSC в условиях *in vitro* методом направленной цитокиновой индукции сепарированных CD33⁺-клеток крови с помощью IL-6 и GM-CSF и CD11b⁺-клеток с использованием двухэтапной стимуляции GM-CSF, IL-1 β и липополисахарида, могут быть использованы в дальнейшем изучении механизмов регуляции функциональной активности MDSC, а также их связи с функционированием иммунокомпетентных клеток не только при физиологическом гестационном процессе, но и при осложнениях беременности или при других иммунозависимых заболеваниях, в которых они могут служить биомаркерами или мишенями для новых терапевтических стратегий.

Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации. В диссертации предложены новые подходы к *in vitro* дифференцировке мононуклеаров периферической крови человека, сепарированных по одному из преобладающих маркеров - CD33 и CD11b, в MDSC, а также определена роль фетоплацентарных белков в конверсии выделенных CD33⁺ - и CD11b⁺ - клеток в фенотип MDSC и их субпопуляций (PMN-MDSC и M-MDSC). Также диссертантом установлена способность альфа-фетопротеина, гликоделина и хорионического гонадотропина воздействовать на продукцию цитокинов в клеточных

культурах. Результаты, полученные в исследовании, значимы как в фундаментальном, так и в прикладном аспекте, а само направление – весьма перспективно по своей сути, поскольку есть основания полагать, что предложенные автором модели генерации MDSC смогут найти свое достойное место в практике научных изысканий в будущем. Полученные результаты не только уточняют пути регуляции MDSC при физиологической беременности посредством их взаимодействий с белками фетоплацентарного комплекса, но и побуждают к исследованию других механизмов подавления MDSC. Использование MDSC в качестве биомаркеров во время аномалий беременности и при других патологических состояниях, а также изучение возможности использования фетоплацентарных белков в качестве иммунофармакологических препаратов обосновывают целесообразность представленной работы.

Принципиальных замечаний по работе К.Ю. Шардиной нет, но при знакомстве с диссертационной работой возникло *несколько вопросов, не ставящих под сомнение научную ценность представленного исследования*:

1) Как Вы объясните тот факт, что среди фетоплацентарных белков только у гликоделина выявлено достоверное, и в ряде случаев - дозозависимое влияние на продукцию некоторых цитокинов в культуре клеток, индуцированных к дифференцировке в MDSC, при том, что у АФП этот эффект отмечен лишь по отношению к IL-19, а влияния ХГЧ на продукцию цитокинов иммунными клетками вообще обнаружено не было?

2) Почему среди внушительного профиля исследуемых в супернатантах цитокинов уровень именно IL-20, IL-26, IL-19, IFN α 2 и TWEAK/TNFsF12 статистически значимо изменяется под влиянием гликоделина?

Заключение о соответствии критериям, установленным Положением о порядке присуждения ученых степеней. Диссертация Шардиной Ксении Юрьевны на тему «Роль фетоплацентарных белков в регуляции дифференцировки и функциональной активности миелоидных супрессорных клеток», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 3.2.7. Иммунология, является самостоятельно выполненной, законченной научно-квалификационной работой, которая содержит решение научной задачи,

имеющей важное значение для специальности 3.2.7. Иммунология и заключающейся в установлении роли белков беременности в процессах генерации MDSC с одновременной оценкой функциональной активности этих клеток. Диссертационное исследование соответствует требованиям раздела II «Положения о присуждении ученых степеней» (утв. постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 (с изменениями от 21.04.2016, 02.08.2016 г., 29.05.2017 г., 28.08.2017 г., 01.10.2018 г., 20.03.2021 г., 11.09.2021 г., 26.09.2022 г., 26.01.2023 г., 18.03.2023 г., 26.10.2023 г., 25.01.2024 г.)), а ее автор Шардина Ксения Юрьевна заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 3.2.7. Иммунология.

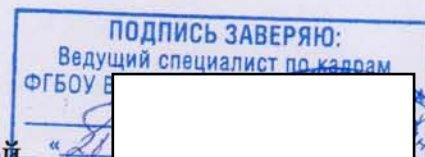
Официальный оппонент,
профессор кафедры клинической иммунологии,
аллергологии и лабораторной диагностики
факультета повышения квалификации и
переподготовки специалистов ФГБОУ ВО
«Кубанский государственный медицинский университет»
Минздрава России,
д.б.н., профессор



Н.В. Колесникова

«18» августа 2024 г.

Подпись д.б.н., профессора Н.В. Колесниковой
ЗАВЕРЯЮ



Название и адрес организации: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России), 350063, г. Краснодар, ул. им. Митрофана Седина, д. 4, тел.: +7(918) 625-25-25, e-mail: nvk24071954@mail.ru.

Отзыв официального оппонента Колесниковой Н.В. поступил «02» сентября 2024 г.
Ученый секретарь Совета 24.1.063.01,
к.б.н.



Ю.А. Журавлева

С отзывом официального оппонента ознакомлен «02» сентября 2024 г.
Соискатель



К.Ю. Шардина

