

Министерство науки и высшего образования  
Российской Федерации (Минобрнауки России)

«УТВЕРЖДАЮ»

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ  
БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ  
ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК  
(ИНЦ РАН)**

Директор Федерального государственного  
бюджетного учреждения науки Институт  
цитологии Российской академии наук  
член-корреспондент РАН

194064 Санкт-Петербург, Тихорецкий пр. 4  
тел. (812) 297-18-34, факс: (812) 297-33-41  
эл.адрес: cellbio@incras.ru; http://www.incras.ru

ИНН 7802030531, КПП 780201001

19.01.2021 № 12316-662- 20



А.Н.Томилин

2021 г.

### ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертационную работу **Рубцова Юрия Петровича** «Клеточные и молекулярные механизмы контроля лимфопрлиферации и аутоиммунитета», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальностям 03.01.03 – молекулярная биология и 03.03.03 - иммунология

**Актуальность темы.** Исследование механизмов возникновения и прогрессирования аутоиммунных заболеваний, вызванных нарушениями иммунологической толерантности, является крайне актуальным и приоритетными в современной биомедицине. Многие вопросы остаются открыты относительно этиологии, патогенеза и соответственно молекулярных механизмов даже наиболее изученных аутоиммунных заболеваний таких как диабет 1 типа и ревматоидный артрит. Аутоиммунным заболеваниям подвержена значительная часть (до 10% населения земли) и наиболее трудоспособная категория населения. Разработка эффективных средств диагностики и лечения таких заболеваний является приоритетной задачей современной биомедицины. Традиционная стратегия лечения аутоиммунных заболеваний включает неспецифическое подавление иммунитета. Данный подход является недостаточно эффективным и впоследствии ведет к системным нарушениям иммунитета и серьезным побочным эффектам. В связи с этим необходимость перехода к более избирательным и эффективным методам так называемой целевой или таргетной терапии является крайне актуальным. Понимания клеточных и молекулярных механизмов, вызывающих

аутоиммунные заболевания позволяет найти новые молекулярные мишени для данной таргетной терапии. Наряду с системой негативной селекции Т-клеток в тимусе, элиминирующей потенциально аутореактивные клетки, существует дополнительная система периферической клеточной толерантности, определяемая специализированными популяциями регуляторных Т-клеток (Трег) и клетками тканевой стромы. Дефицит функциональной активности данных клеток ведет к развитию аутоиммунных заболеваний. Кроме того, локальное увеличение функциональной активности иммуносупрессорных клеток, включая Трег, ассоциировано с развитием злокачественных солидных опухолей. Таким образом понимание молекулярных механизмов, обеспечивающих правильное функционирование регуляторных Т-клеток позволяет решить важные фундаментальные и практические проблемы и помогает существенно расширить арсенал таргетной терапии аутоиммунных и онкологических заболеваний.

В связи с этим следует признать актуальной тему диссертационной работы Рубцова Ю.П., посвященной исследованию клеточных и молекулярных механизмов контроля лимфопрлиферации и аутоиммунных заболеваний, реализуемых иммуносупрессорными регуляторными Т-клетками и мезенхимными стромальными клетками.

**Степень обоснованности, достоверность и новизна научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.** В результате проведенных исследований были решены все поставленные задачи. В работе был использован широкий спектр современных молекулярно-биологических, биохимических и клеточно-культуральных методов исследований, включая методы генетической инженерии и технологии создания трансгенных животных, методов иммунохимического анализа, иммунофенотипирования и проточной цитофлуориметрии, различных видов хроматографии, широкомасштабного секвенирования и микрочипового транскриптомного анализа. Представленный обширный экспериментальный материал и статистический анализ данных подтверждает достоверность представленных результатов. Результаты проведенных исследований были опубликованы в ряде высокорейтинговых журналов *Journal of Experimental Medicine*, *Immunity*, *Science* и *Nature Immunology*.

В рамках данной работы впервые была создана генетическая мышьяная модель, позволяющая селективно инактивировать гены интереса, участвующие в иммуносупрессорной активности регуляторных Т-клеток. С помощью данной модели Рубцов Ю.П. существенно расширил современные знания о молекулярных и клеточных механизмах, ответственных за поддержание функции и генез развития регуляторных Т-клеток. Используя метод генетического маркирования с помощью Cre-lox индуцированной рекомбинации автор впервые доказал стабильность фенотипа и функций регуляторных Т-клеток на протяжении всей продолжительности жизни животного. Данные клетки крайне редко теряют экспрессию Foxp3 зависят от интерлейкина IL-2, и стабильно поддерживаются в условиях лимфопении и бактериальной инфекции. Автором убедительно показано, что секретируемый данными клетками IL-10 не вовлечен в поддержания системной иммунологической толерантности, но функция данного интерлейкина крайне важна в подавлении воспаления в барьерных тканях, контактирующих с большим количеством чужеродных антигенов.

С помощью Трег-специфического нокаута гена Foxp1 автором была впервые установлена функция данного транскрипционного фактора в поддержании Foxp3-опосредованной транскрипционной программы, обеспечивающей поддержание фенотипа и функции регуляторных Т-клеток. Данные исследования убедительно показали, что Foxp3 хуже связывает хроматин в отсутствие Foxp1, вызывая угнетение супрессорной активности Трег, а также Foxp1 имеет свою независимую от Foxp3 функцию в данных клетках. Рубцовым Ю.П. также была впервые показана важная иммуносупрессорная функция молекулы ICAM-1 на поверхности мезенхимных стромальных клеток человека в способности ингибировать активацию Т-лимфоцитов за счет паракринных или контактных механизмов в культуре клеток *in vitro*.

Помимо фундаментальной значимости диссертационная работа Рубцова Ю.П. включает в себя разработку перспективных методов малоинвазивной диагностики и терапии аутоиммунного заболевания, ревматоидный артрит. Автором проведено несколько клинических исследований, в результате которых была выявлена корреляция между снижением количества и статуса активации Трег с тяжестью течения заболевания и

вероятностью ответа на терапию метотрексатом у больных ревматоидным артритом. Таким образом анализ популяции активированных Трег является новым прогностическим маркером при терапии метотрексатом у больных ревматоидным артритом.

Таким образом данная диссертационная работа открывает новое понимание молекулярных механизмов поддержания и функционирования одних из главных иммуносупрессорных клеток, регуляторных Т клеток, вовлеченных в периферическую толерантность у млекопитающих. Также нужно отметить, что полученные знания о поддержании регуляторных Т клеток важны для трансплантологии. А именно, тот факт, что специфичные популяции Трег поддерживаются в организме на протяжении жизни дает основание на эффективном использовании данных клеток для обеспечения продолжительного приживания аллотрансплантата. Научные положения настоящей работы расширяют и углубляют современные представления о механизмах иммунологической толерантности как с фундаментальной точки зрения, так и в перспективе создания новых методов терапии аутоиммунных заболеваний.

Приведенные в работе научные положения, выводы и рекомендации аргументированы, основаны на фундаментальных научных положениях, общепринятых теоретических закономерностях, опираются на экспериментальные данные и являются их логическим следствием. Научно-практическая значимость рукописи не вызывает сомнений.

Манускрипт диссертации написан хорошим, четким и ясным научным языком. Диссертация построена по традиционному плану. Она состоит из разделов: список сокращений, введение или актуальность проблемы, обзор литературы, и разделов, описывающих, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, выводы и цитируемая литература. Работа изложена на 211 страницах, содержит 38 рисунков и 4 таблицы. Список цитируемой литературы включает 421 источников. Диссертация обобщает данные 21 научных статей. В введении диссертации обоснована актуальность выбранной темы и обозначены цели и задачи исследования, а также отражены научная новизна и практическая значимость работы. Обзор литературы исчерпывающе описывает все научные достижения касающиеся области диссертационной работы и состоит из 16 подразделов. Раздел

«материалы и методы» приводит достаточно детальное и ясное описание более 30 используемых в работе методов. Раздел «результаты и обсуждение», состоящий из 4 больших разделов, содержащих от 6 до 11 подразделов, написан очень хорошо и четко. Выводы диссертации сформулированы последовательно и четко, соответствуют представленным экспериментальным результатам и поставленным в начале работы задачам. Автореферат полностью отражает основное содержание диссертационной работы, название отражает суть проделанной работы.

**Личный вклад соискателя в разработку научной проблемы.** Основные результаты работы получены лично автором и руководимыми им аспирантами и студентами, а также при его непосредственном участии, включая планирование и проведение экспериментов. Личный вклад соискателя состоит также в обработке, интерпретации, анализе и апробации экспериментальных данных, и подготовке публикаций по выполненной работе.

**Полнота изложения основных результатов диссертации в публикациях автора.** Представленные результаты прошли широкую апробацию в форме докладов, в том числе пленарных, на международных и всероссийских научных конференциях и симпозиумах. Основные результаты диссертационной работы отражены в 21 публикации в рецензируемых журналах, входящих в перечень ВАК. Имеется три российских патента на изобретение.

**Рекомендации по использованию результатов исследования.** Результаты диссертационной работы могут способствовать появлению в клинической практике новых методов диагностики и прогноза аутоиммунных заболеваний. Кроме того, результаты исследований будут способствовать повышению значимости использования регуляторных Т-клеток в трансплантационной медицине. Материалы диссертации могут быть использованы в учебном процессе при чтении лекций спецкурсов по молекулярной иммунологии и биоорганической химии в Учебно-научном центре ИБХ РАН и кафедрах Химического факультета и Факультета фундаментальной медицины Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова и ряде других учебных и научных центров России, а также в ходе выполнения выпускных квалификационных работ студентами этих кафедр.

### **Замечания по диссертационной работе.**

Манускрипт диссертации и автореферат написаны хорошим, ясным языком. Замечены небольшое количество опечаток и стилистических погрешностей. Следующие замечания по оформлению диссертации:

Для лучшего прочтения предпочтительно давать определения/пояснения названиям генов или белков при первом их упоминании как в названии глав/разделов, так и в тексте. К примеру – транскрипционный фактор Foxp1, или протеинкиназа Akt, интерлейкин IL2 и так далее.

В тексте работы присутствуют плохо русифицированные термины, например, «кондиционный аллель» лучше заменить на «условный аллель». Также присутствует в тексте научный сленг - «гейты» следует заменить на «рамки» или «заданные рамки».

mTEC (клетках эпителия тимуса) правильнее писать - клетках эпителия тимуса мыши (mTEC) - стр. 26. CD4CD8 DP (double positive) или SP (single positive) правильнее русифицировать, положительных по одному или двум маркерам или «+», «++» - стр.26. Имена ученых предпочтительно русифицировать Hsieh и Lafaille – Сейх и Лафайл (Hsieh и Lafaille) - стр.26.

Необходимо дать объяснение термину - элемент-«пионер» - стр. 31. Отсутствует перевод для NOD (nonobese diabetic) - стр. 35, IBD (inflammatory bowel disease) – стр. 63. Отсутствует расшифровка сокращения CNS (conserved non-coding sequences) и CNS2 (conserved non-coding sequence 2) в списке сокращений – стр. 28.

В тексте нет пояснения аббревиатуре nTрег при первом упоминании (должно быть - натуральные регуляторные Т-клетки) и объяснения чем они отличаются от регуляторных Т-клеток - стр.70. Нет пояснения аббревиатуре LPL при первом упоминании в тексте – лимфоциты из базальной пластинки lamina propria, стр. 78, также для OVA – стр. 79. Необходим перевод и пояснение для i.p. инъекции - стр. 79. Отсутствует (рис. S12), опечатка на стр. 123. Нет пояснения сокращению K/BxN – стр. 125, и сокращению PBMC – стр. 161.

Обозначения на оригинальных рисунках не русифицированы, что немного затрудняет прочтение.

Следует отметить, что сделанные замечания никак не касаются существа диссертационной работы и не умаляют значимости полученных в ней результатов.

**Заключение.** Представленная диссертация работа Юрия Петровича Рубцова по актуальности темы, научной новизне, объему проведенных исследований и практической значимости полученных результатов является цельным и законченным научно-квалификационным исследованием, которое можно квалифицировать как научное достижение, имеющая важное практическое и теоретическое значение и соответствует всем критериям (в частности, п.9), установленным "Положением о присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; от 29.05.2017 г. № 650), а ее автор, Рубцов Ю.П., безусловно заслуживает присвоения искомой степени доктора биологических наук по специальностям 03.01.03 – молекулярная биология и 03.03.03 - иммунология.

Отзыв обсужден и утвержден на заседании межлабораторного семинара Лаборатории молекулярной биологии стволовых клеток и Лаборатории регенеративной биомедицины ИИЦ РАН (протокол № 1 от 18 января 2021 г.).

Старший научный сотрудник лаборатории  
биологии стволовых клеток,  
кандидат биологических наук

Тихорецкий пр. 4, Санкт-Петербург 194064, Россия  
Телефон 8-911-214-48-07  
Электронная почта: [sinenkos.a@gmail.com](mailto:sinenkos.a@gmail.com)

С.А.Синенко

Главный научный сотрудник ИИЦ РАН  
с возложением обязанностей заведующего лабораторией  
молекулярной биологии стволовых клеток  
доктор биологических наук, член-корреспондент РАН

Тихорецкий пр. 4, Санкт-Петербург 194064, Россия  
Телефон (812)297-18-34  
Электронная почта: [a.tomilin@incras.ru](mailto:a.tomilin@incras.ru)

А.Н.Томилини

