

ОТЗЫВ

официального оппонента 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

Представленная к защите работа Рубцова Ю.П. посвящена изучению фундаментальных механизмов иммунологической толерантности, которые препятствуют развитию спонтанных и индуцированных лимфопрлиферативных аутоиммунных заболеваний. В последнее время такие заболевания, к которым относятся аутоиммунный диабет, рассеянный склероз, ревматоидный артрит (РА), псориаз и болезнь Крона стали настоящим бичом современного человечества. Автор провел комплекс оригинальных исследований, которые отвечают на ряд фундаментальных вопросов современной иммунологии, касающихся поддержания иммунологической толерантности в тканях, контактирующих с внешними патогенами (легкие, кожа, кишечник), состояния иммуносупрессорных клеток у пациентов с ревматоидным артритом, а также молекулярных механизмов, обеспечивающих контроль активации лимфоцитов на уровне ткани за счет контактов с мезенхимными клетками стромы. Результаты имеют очевидное практическое применение. Разработанные автором новые подходы к диагностике и оценке состояния особых популяций иммуносупрессорных Т-клеток при ревматоидном артрите могут использоваться для подбора адекватной стратегии терапии у пациентов с этим тяжелым заболеванием.

Основное направление исследований, представленных Рубцовым Ю.П., посвящено функции т.н. регуляторных Т-клеток (или Treg), специальной популяции лимфоцитов-хелперов, которые обладают мощными иммуносупрессорными свойствами. Автором созданы и охарактеризованы новые генетически модифицированные линии мышей, проведение экспериментов с которыми позволило Рубцову Ю.П., получить ценные данные, касающиеся роли цитокина IL-10 в иммуносупрессорной программе Treg, а также стабильности популяции Treg мышей в нормальных условиях, при разных видах лимфопрлиферации и ответе на инфекции. Кроме этого, автором детально изучено состояние Treg крови пациентов с ревматоидным артритом, а также поведение этой популяции в ходе терапии метотрексатом. Эти результаты доказывают прогностическую значимость изучения Treg пациентов с РА, в том числе, для выбора адекватной терапии. В дополнение к этому автор идентифицировал ранее неизвестную роль молекулы клеточной

адгезии ICAM-1, представленную на поверхности мезенхимных стромальных клеток, в обеспечении локальной тканевой иммуносупрессии.

Работа изложена на 211 страницах, содержит 62 рисунка и 4 таблицы. Она построена по классическому принципу и включает в себя разделы «Введение», «Литературный обзор», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы» и «Список литературы». Литературный обзор занимает примерно 1/3 от общего объема диссертации полностью посвящен описанию истории открытия Treg, идентификации молекулярных механизмов образования этих клеток, формирования и поддержания иммуносупрессорной программы, связанной в первую очередь, с фактором транскрипции Foxp3. Количество ссылок 421, существенная часть которых относится к работам последнего десятилетия.

Литературный обзор очень подробный, даже слишком в своей исторической части. При таком подходе можно было бы начать и с работ 70-80-х годов прошлого века по T-супрессорам, особенно таких классиков, как Gershon и Tada, но диссертация все же не учебник. С другой стороны, мне не приходилось встречать столь подробного изложения исследований транскрипционного фактора Foxp3 и функционирования популяции клеток Treg. Думаю, что было бы вполне разумно, если автор подготовит и напечатает хороший обзор по проблеме. Еще продуктивнее было бы обратиться в международный журнал типа *Frontiers in Immunology* (или выше по рангу) с предложением выпустить тематический номер по проблеме Treg. Ю. П. Рубцов мог бы выступить в качестве издателя (соиздателя) такого сборника и автора одного из обзоров, например, по разделам «Treg и короткие ингибирующие РНК» или «Treg и ревматоидный артрит» – темы привлекли бы большое внимание. Можно было бы в литературный обзор вставить и разделы по ревматоидному артриту и мезенхимным стромальным клеткам (в представленной диссертации эти сведения предваряют соответствующие результаты), но это не обязательно.

Раздел Материалы и методы представляется во многом ключевым для данной работы. Фенотипические и функциональные характеристики работы отдельных популяций клеток, в первую очередь клеток Treg, можно было адекватно исследовать только при условии получения линий мышей, полученных с помощью генетических манипуляций, позволяющих изолировать, наблюдать и оценивать конкретные популяции T-лимфоцитов. Все это было целенаправленно проделано автором с помощью многочисленных коллег, предоставивших «генетические заготовки» в виде мышей с уже измененными геномами, которые автор доводил до требуемых параметров методами генетической рекомбинации. Такое понимание необходимости создания моделей *in vivo* с заранее заданными свойствами все еще редко встречается в российской науке и должно

послужить вдохновляющим примером. Мне представляется, что в разделе Результаты автор делает акцент именно на эту особенность работы, еще раз подчеркивая, для чего выводили мышей со столь сложно модифицированной генетикой. Нельзя работать просто с тем, что под рукой, нужно доводить модель на животных до полной аналитической адекватности.

В этой связи, в работе Ю. П. Рубцова, кроме почти всех замечательно поставленных экспериментов, видится одна шероховатость. Аллергические реакции в респираторном тракте, в частности с индукцией овалбумином астмы в трансгенных мышцах с OVA-специфичными TCR и простой аллергии к OVA, гораздо адекватней моделировать в мышцах на генетической основе BALB/c, поскольку у этих мышей есть природный генетический сдвиг иммунного ответа по пути Th2. Там нельзя быстро провести тонкий анализ с помощью кондиционного нокаута (вся эта кухня подогнана под основу B6), но простые оценочные эксперименты по определению популяции Treg и ее иммунологической активности, какие и были поставлены, был бы хорошим дополнением к работе или ее модификацией. Автор и сам замечает, что легочные фенотипы в данной модели сравнительно слабы. Мне представляется, что невысокое проявление воспалительного фенотипа в ткани легкого у мышей с избирательным нокаутом IL-10 в Treg (Рис. 4А), как и отсутствие подъема экспрессии гена для IL-4, но не для IFN- γ (стр. 111, для основы B6 именно ответ по типу 1 черта характерная) может объясняться не совсем удачно выбранной генетикой хозяина.

Все методы по выделению нуклеиновых кислот, их секвенированию, иммунопреципитации хроматина и другая молекулярная часть работы, а также иммунологические и биохимические методы, соответствуют нормальному высокому уровню и оцениваются мной исключительно положительно.

В контексте данного отзыва нет особого смысла подробно останавливаться на работах, которые диссертант выполнил во время пребывания в лаборатории проф. А. Ю. Руденского в Университете Вашингтона, Сиэтл. Упомянутые выше экспериментальные работы по функционированию Treg в барьерных органах, а также громадная работа по эпигенетическим аспектам регуляции экспрессии факторов воспаления, цитокинов и других регуляторных молекул, связанных с посадкой на хроматин транскрипционных факторов Foxp3 и Foxp1 были доведены до полного завершения. Этот материал, а также данные по взаимовлиянию связывания Foxp3 и Foxp1 с хроматином, были напечатаны в журналах высшего уровня (J Exp Med, Science, Nature и т. д.), рецензировались экспертами высокого класса и составляют основу рецензируемой работы, что позволяет высоко ее оценить.

Необходимо еще отметить, что диссертационная работа Ю. П. Рубцова построена по алгоритму, принятому теперь для больших статей в «больших» журналах: требуется сочетание экспериментальных данных хотя бы с какими-то клиническими наблюдениями, сделанными в том же направлении и соответствующими выдвинутым гипотезам. Такой подход тоже следует признать ценной частью диссертационной работы, в рамках которой проведено клиническое исследование роли иммуносупрессии и регуляторных Т-клеток при важном заболевании с четко выраженной аутоиммунной составляющей – ревматоидным артритом (РА).

Этот раздел работы изложен чрезвычайно подробно и содержит практически важные наблюдения, показывающие связь между количеством и степенью активации регуляторных Т-клеток с тяжестью течения РА, а также представляет корреляционный анализ между количественными и фенотипическими (рецепторными) характеристиками Treg и эффективностью лечения заболевания метотрексатом. Данный раздел работы имеет несомненную диагностическую и прогностическую значимость и является ценным дополнением к аналитической части работы. Однако недостатком изложения данных этого следует признать частое дублирование показателей в иллюстрациях и тексте (это избыточно), а также отсутствие попыток сделать иллюстрации более простыми для восприятия и более интегральными.

Несколько особняком стоит раздел диссертации, посвященный иммуносупрессорным свойствам мезенхимных стромальных клеток (МСК). Эта своеобразная популяция плюрипотентных клеток действительно проявляет ингибирующую активность в отношении Т-лимфоцитов, и важную роль в этом процессе играет, в частности, молекула ICAM-1, что убедительно показано в диссертации Ю. П. Рубцова. Но одна важная особенность данного раздела работы – это экспериментирование исключительно с культурами клеток. Понятно, что избрав стратегию получения МСК из жировой ткани людей, автор и не мог поставить какие-то эксперименты *in vivo*, но в настоящее время без подтверждения в реальной физиологической ситуации результаты выглядят скупо. Недаром, публикации по этому разделу работы гораздо скромнее, чем по другим. Впрочем, технически и методически работа проведена на высоком уровне и, главное, вполне вписывается в общую тему работы – что есть регуляция иммунного ответа на молекулярном уровне?

При очень высокой оценке работы в целом, хотелось бы пожелать автору гораздо сосредоточеннее работать над качеством своих текстов. Огромное количество калек с лабораторного жаргона, странных сокращений (в частности, мне даже трудно понять, где автор мог видеть сокращение «Б-клетки»), стилистически необработанных

фраз не влияют, конечно, на научную ценность работы, но уж точно не помогают ее прочтению. Высказанные замечания – это скорее пожелания автору на будущее, общая оценка этой важной работы остается высокой.

Автореферат соответствует содержанию диссертации, а сама диссертация полностью отражена в научных статьях, опубликованных автором в ведущих российских и зарубежных журналах, результаты работы доложены на отечественных и международных конференциях.

Диссертация Рубцова Ю.П. «Клеточные и молекулярные механизмы контроля лимфопротиферации и аутоиммунитета» полностью отвечает требованиям "Положения 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), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а её автор Рубцов Юрий Петрович заслуживает присуждения искомой степени доктора биологических наук по специальностям 03.01.03 – молекулярная биология и 03.03.03 - иммунология.

Официальный оппонент:

Заведующий Лабораторией
иммуногенетики Федерального
государственного бюджетного
научного учреждения Центральный
научно-исследовательский институт
туберкулеза
д.б.н., профессор

Апт Александр Соломонович

107564 г. Москва, Яузская аллея, д.2
Тел: +7 (916) 350-20-82
E-mail: alexapt0151@gmail.com

Подпись Апта Александра Соломоновича заверяю

Ученый секретарь ФГБНУ ЦНИИТ
кандидат психологических наук



Золотова Н.В.

Дата: 20.01.2021