

## ОТЗЫВ

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

### **Актуальность темы выполненной работы**

Как следует из названия, работа Рубцова Ю.П. посвящена изучению фундаментальных механизмов сохранения иммунологической толерантности. Поддержание невосприимчивости иммунной системы к собственным клеткам, тканям и органам необходимо для того, чтобы предотвращать развития аутоиммунных заболеваний, которые являются серьезной проблемой современного человечества. Тяжелые аутоиммунные заболевания, такие как ревматоидный артрит, системная красная волчанка, псориаз, болезнь Крона и диабет 1 типа поражают всё больший процент жителей развитых стран. Изучение клеточных и молекулярных механизмов торможения иммунного ответа так называемых иммуносупрессорных механизмов является актуальной научной проблемой, поскольку является ключом для понимания патогенеза этих заболеваний, а также определяют разработку селективных методов терапии аутоиммунных заболеваний. Решающую роль в иммуносупрессии играет специализированная популяция CD4+ Т-хелперных лимфоцитов человека, которую принято называть Treg. Эта популяция образуется в тимусе, а также периферических органах. Она характеризуется уникальным фенотипом и обладает необычной иммуносупрессорной активностью в отношении эффекторных Т-клеток, а также популяций миелоидных и лимфоидных клеток системы врожденного иммунитета. Формирование Treg требует синтеза фактора транскрипции Foxp3. Этот высокоспецифичный для Treg белок меняет структуру хроматина определенных генов, что приводит к образованию характерного фенотипа и функциональных свойств Treg. Фактор Foxp3 определяет поддержание фенотипа и сохранение иммуносупрессорных функции Treg.

Учитывая сказанное, настоящая работа, нацеленная на изучение характеристик популяции Treg, а также роли некоторых Treg специфичных молекул, является актуальным научным исследованием, которое имеет как фундаментальное, так и практическое значение.



### **Научная новизна и научно-практическая значимость полученных результатов**

Автором были созданы несколько геномодифицированных линий мышей, которые позволяют получать Cre-опосредованный кондиционный нокаут генов в регуляторных Foxp3+ T-клетках. С помощью этих линий были впервые получены кондиционные, а также индуцибельные нокауты генов IL-10, а также Foxp1. С помощью полученных линий мышей были изучены новые аспекты функционирования Treg. Проведенные генетически контролируемые исследования на мышах позволили перейти автору к изучению роли Treg в некоторых аутоиммунных заболеваниях человека. В частности, было показано, что у пациентов с ранним нелеченым ревматоидным артритом тяжесть заболевания коррелировала с пониженным количеством Treg, которые несут меньшее количество маркеров активации. В то же время эффективность терапии метотрексатом прямо коррелировала с увеличением числа Treg в крови и увеличением уровня маркеров активации. Полученные результаты открывают новые возможности для использования Treg в качестве прогностического маркера при ревматоидном артрите.

### **Достоверность и степень обоснованности выводов, сформулированных в диссертации**

Достоверность представленных в диссертации данных и сделанных выводов обусловлена значительным объемом экспериментального материала, а также использованием адекватных генетических методов. Результаты работы были опубликованы в журналах с высоким импакт-фактором и прошли самое строгое рецензирование. Это гарантирует, что полученные результаты и сделанные на их основе выводы являются достоверными.

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

Диссертационная работа состоит из 211 страниц, которые включают 62 рисунка и 4 таблицы. Манускрипт написан по классической схеме, и содержит следующие разделы: «Введение», «Литературный обзор», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы» и «Список литературы». Во Введении формулируются исходные положения, анализ которых показывает актуальность выбранной темы исследования. Во Введении также обоснован выбор цели работы и поставлены исследовательские задачи, которые необходимо решить для достижения заявленной цели.

Глава 2 содержит обзор литературы. Обзор очень обширный и практически полностью посвящен различным вопросам дифференцировки, выживания, активации и иммуносупрессорной программы Treg. Отдельно стоит отметить, что фокус на Treg неизбежно привел к тому, что обзор, в значительной степени, описывает многочисленные факторы, связанные с активацией транскрипции и поддержанием активности гена фактора



транскрипции Foxp3. Диссертация содержит 421 ссылку на литературные источники, большая часть которых представлена работами последних лет. Основательно проведенный литературный обзор логично подводит автора к целям и задачам собственного исследования.

В разделе «Материалы и методы» подробно описываются приемы, которые автор использовал для получения различных геномодифицированных мышей. Особое внимание Рубцов Ю.П. уделяет контролям, применение которых гарантировало корректность произведенных генетических замен. В работе использованы самые современные молекулярно-биологические методы, такие как: манипуляции с генами, секвенирование РНК, иммунопреципитация хроматина с последующим секвенированием ДНК, а также биоинформатический анализ. Рубцов Ю.П. широко использовал различные геномодифицированные линии мышей, полученные в других лабораториях, и которые были предоставлены автору для проведения совместных исследований. Наряду с этим Рубцовым Ю.П. были созданы свои собственные оригинальные линии мышей, которые позволили значительно расширить исследования и выполнить их на новом более высоком уровне. Молекулярно-биологические методы исследования удачно сочетаются с физиологическими исследованиями, которые включали в себя такие методы как гистопатологическая оценка спонтанного колита, исследование аллергического воспаления легких, а также реакции кожно-контактной гиперчувствительности. Значительное место в работе занимают также иммунологические методы исследования: экспериментальная инфекция лабораторных животных, адоптивный перенос Т-клеток, измерение уровня сывороточных антител и другие классические приемы. Совокупность использованных методов позволила автору выполнить исследование на очень высоком методическом уровне.

Раздел «Результаты и Обсуждение» начинается с описания того, каким образом были получены новые геномодифицированные линии мышей. Прежде были получены трансгенные knock-in мыши, у которых ген Foxp3 дикого типа был заменен на сконструированный ген Foxp3, включающий в свой состав ген рекомбиназы Cre. Создание этой линии положило основу для дальнейшего получения других трансгенных линий, в которых те или иные гены можно было нокаутировать кондиционным образом. Важным методическим шагом явилось также получение мышей, у которых все Treg были генетически мечены флуоресцирующим белком. В дальнейшем это позволило автору решить многие тонкие вопросы, связанные с физиологией Treg.

Автором созданы генетические модели на мышах, которые позволяют реализовать кондиционный Treg-специфический нокаут отдельных, важных для функционирования



Treg генов, а также определять факторы, влияющие на стабильность и синтез Foxp3 в контексте целого организма мыши. В результате использования этих моделей, Рубцов Ю.П. установил роль IL-10, секретируемого Treg, в поддержании иммунологической толерантности и контроле воспаления в тканях толстого кишечника, легких и коже, которые контактируют с большим числом микроорганизмов и антигенами пищи. В то же время, этот цитокин не принимает участия в поддержании системной иммунологической толерантности. Кроме того, Рубцов Ю.П. детально изучил участие гомолога Foxp3, фактора транскрипции Foxp1, в реализации функции Foxp3 в Treg, а также поддержании фенотипа и функций Treg мыши.

Иммунологические исследования автора, вошедшие в диссертационную работу, затрагивают сразу несколько аспектов проблемы поддержания иммунологической толерантности. Главная и самая большая часть представляет собой подборку результатов исследования специализированной иммуносупрессорной популяции Т-хелперных (CD4) лимфоцитов человека, которые принято называть Treg. Образование в тимусе и периферических органах популяции этих клеток, уникальных по фенотипу и обладающих необычной иммуносупрессорной активностью в отношении обычных Т-клеток, а также в отношении популяций миелоидных и лимфоидных клеток системы врожденного иммунитета, требует синтеза фактора транскрипции Foxp3. Этот высокоспецифичный для Treg белок, меняя структуру хроматина генов, отвечающих за фенотип Treg и их иммуносупрессорные свойства, определяет поддержание фенотипа и функции Treg.

Вторая, более прикладная, клиническая часть рассматриваемой работы состоит в изучении связи количества и фенотипа Treg в крови пациентов с ревматоидным артритом с тяжестью течения этого аутоиммунного заболевания, а также прогнозом и восприимчивостью пациентов к терапии метотрексатом. Этот раздел работы без преувеличения можно причислить к модному направлению, которое получило название «трансляционная иммунология». Методические приемы, которые автор отработал на мышинной модели, а также теоретические выводы, к которым привело исследование на лабораторных животных, были транслированы в подходы, которые Рубцов Ю.П. использовал при изучении ревматоидного артрита. Автором были получены важные с клинической и прикладной точек зрения данные, касающиеся связи состояния Treg с прогнозом и выбором стратегии для терапии ревматоидного артрита. Без сомнения, эта часть работы является хорошим заделом для будущего исследования ревматоидного артрита и возможно других аутоиммунных заболеваний человека.

Третье направление исследований автора было связано с изучением локальной толерантности на уровне ткани, которая может частично определяться



иммуносупрессорной активностью мезенхимных стромальных клеток. Эти клетки, особенно многочисленные в костном мозге и висцеральной жировой ткани, обладают мощным секреторным потенциалом. Для них, на уровне культур клеток, доказана способность ингибировать активацию Т-лимфоцитов, требующую реализации паракринных секреторных и контактных (с участием молекул клеточной адгезии) механизмов супрессии. Автором в системе смешанных культур Т-клеток и МСК доказано, что молекула клеточной адгезии ICAM-1 играет ключевую роль в реализации механизмов контактной иммуносупрессии. Этот важный результат существенно расширяет наши представления о возможной реализации механизмов иммуносупрессии с помощью тканевой стромы.

Выводы диссертации конкретны и полностью соответствуют цели и задачам выполненного исследования.

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

По диссертации имеются некоторые замечания.

В нескольких местах диссертации говорится о «создании линий мышей для Cre-опосредованного кондиционного нокаута генов в регуляторных CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Т-клетках». Насколько уместно в этом выражении использовать указание на CD4<sup>+</sup> клетки? Как я понимаю, условием образования нокаута является экспрессия Foxp3. CD4 просто коэкспрессируется на Foxp3<sup>+</sup> Т-клетках, при этом CD4 никаких дополнительных условий для нокаута не создает. Я считаю, что упоминание о CD4 во фразе «Cre-опосредованного кондиционного нокаута генов в регуляторных CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Т-клетках» является излишним и его можно опустить. Это будет и сути более верно, и не будет читателя вводить в заблуждение.

Автор проводит разделение между «эффекторными» и «регуляторными» Т-клетками. К первым автор относит Т-киллеры и Т-хелперы, а к последним Трег. Без сомнения, Т-киллеры являются эффекторными клетками, однако отнесение Т-хелперов к этому типу клеток, а особенно их противопоставление Трег, мне представляется не вполне оправданным. Если Т-хелперы относить к эффекторным клеткам, то непонятно по какому признаку они отличаются от Трег. Я понимаю, что в отношении регуляторных клеток Рубцов Ю.П. использует довольно распространённую классификацию, поэтому мое замечание обращено не столько к автору, сколько является дискуссионным.



Вызывает возражения отнесение ревматоидного артрита и некоторых других аутоиммунных патологий к «лимфопрролиферативным заболеваниям».

Необоснованным является противопоставление «фенотипических и активационных маркеров». Правильней было бы говорить о «линейных и активационных маркерах».

Рисунок 4-2 в диссертации и рисунок 2 в автореферате называется, как «Мыши для индуцируемого мечения ...», однако мышей на рисунке не видно.

Высказанные замечания не затрагивают полученных результатов и сущности сделанных выводов, а также не влияют на общую положительную оценку рассматриваемой диссертации.

### **Заключение**

Диссертация Рубцова Ю.П. «Клеточные и молекулярные механизмы контроля лимфопрролиферации 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 иммунохимии  
Федерального государственного бюджетного  
учреждения «Государственный научный  
центр «Институт иммунологии»  
Федерального медико-биологического  
агентства

115522 г. Москва, Каширское шоссе, 24

Тел: +7 (916) 3960413

E-mail: avfilat@yandex.ru

Филатов Александр Васильевич

Подпись Филатова Александра Васильевича заверяю

Ученый секретарь ФГНУ ГИЦ  
«Институт Иммунологии» ФМБА  
к.м.н Власов А.А.

Дата: 19.01.2021

