

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ФГБУ «ГНЦ Институт
иммунологии» ФМБА России
доктор медицинских наук, профессор,
член-корреспондент РАН

М.Р. Хаитов

« » мая 2023 года



ОТЗЫВ

ведущей организации о научно-практической значимости диссертационной работы Вавиловой Юлии Дмитриевны на тему «Изменение популяционного состава и характеристик системы шаперон-зависимого гомеостаза у циркулирующих клеток иммунной системы при развитии болезни Паркинсона», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – «Молекулярная биология»

Актуальность темы исследования

Болезнь Паркинсона (БП) является одной из важнейших медико-социальных проблем ввиду значительной распространенности и хронического прогрессирующего течения. Вероятность развития БП возрастает с увеличением продолжительности жизни. Нейродегенерация, вызванная гибелью дофаминергических нейронов черной субстанции головного мозга, при БП связана с недостаточностью клеточного протеостаза, а именно, аутофагии, убиквитин-протеосомной системы или системы белков-шаперонов семейства 70 кДа (HSP70).

Согласно современным представлениям, ключевое значение в стратегии борьбы с нейродегенеративными заболеваниями имеет ранняя диагностика патологического процесса, особенно диагностика болезни на доклинической стадии. Поздняя диагностика данного заболевания в настоящее время является одним из существенных ограничений в лечении. Наблюдаемые клинические симптомы БП, на основе которых ставится диагноз, проявляются на той стадии, когда количество дефектных/потерянных дофаминергических нейронов достигает уже 60-80%. Несмотря на многочисленные исследования этиологии и патогенеза БП, применяемые методы диагностики недостаточно оптимальны, в том числе для отслеживания прогрессирования заболевания.

Таким образом, остается актуальной потребность в выявлении проверенных биомаркеров с высокой степенью чувствительности и специфичности, с целью улучшения диагностики БП, что необходимо для успешного лечения. Для диагностики БП не рекомендуется применять единственный биомаркер, однако, в перспективе, их можно рационально комбинировать. Диагностические биомаркеры клеток и плазмы крови являются оптимальными из-за их доступности и минимальной инвазивности.

Все вышеизложенное определяет безусловную актуальность настоящего исследования для медицинской науки и практики.

Соответствие темы диссертации научной специальности

Диссертационная работа Вавиловой Ю.Д. выполнена на базе Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук и посвящена исследованию изменений популяционного состава и характеристик системы шаперон-зависимого гомеостаза у циркулирующих клеток иммунной системы при развитии болезни Паркинсона. Тематика диссертации полностью соответствует паспорту научной специальности «1.5.3 –Молекулярная биология».

Основные результаты диссертационной работы и их достоверность

Основные результаты работы представлены двумя направлениями. Первое заключается в анализе изменения работы системы молекулярных шаперонов HSP70 в мононуклеарах и нейтрофилах периферической крови при БП. Второе – в определении фенотипических и функциональных особенностей Т-лимфоцитов и NK-клеток у пациентов с БП.

В рамках первого направления диссертантом получены и представлены данные о внутриклеточном содержании конститутивного и стресс-индуцированного белка HSP70 в периферических мононуклеарах и нейтрофилах человека в отсутствие стресса, а также о влиянии гипертермии на концентрацию этих белков. Было проведено сравнение указанных показателей для клеток пациентов с БП и доноров, не страдающих данным заболеванием. Кроме того, был проведен анализ транскрипционной активности генов *HSPA8*, *HSPA1A/B*, *HSPA1A*, *HSPA1B* и *HSPA6*, кодирующих различные белки семейства HSP70, и обнаружено увеличение относительной базальной транскрипции стресс-индуцированных генов *HSPA1A* и *HSPA6* в периферических мононуклеарах, но не в нейтрофилах пациентов с БП по сравнению с донорами. Также диссертантом была выявлена взаимосвязь между уровнем спонтанного апоптоза и

внутриклеточным содержанием белка p62 в периферических мононуклеарах пациентов с БП. И наконец, диссертантом был проведен ROC-анализ, позволивший сделать вывод о том, что комбинация внутриклеточного содержания белка p62 и мРНК гена *HSPA6* в периферических мононуклеарах может быть использована в качестве биомаркеров для выявления БП на ранних стадиях.

Далее в работе представлены данные, полученные путем анализа популяций Т-лимфоцитов и НК-клеток периферической крови у пациентов с БП и доноров. Опираясь на данные о влиянии цитомегаловирусной инфекции (CMV) на исследуемые показатели, диссертантом был проведен анализ и выявлена 100% инфицированность CMV пациентов с БП. Этот факт далее был учтен при подборе доноров для группы контроля. Было показано, что наблюдаемое при БП увеличение доли активированных НК клеток обусловлено инфекцией CMV. Диссертантом был проведен анализ субпопуляций Т клеток различной стадии дифференцировки: наивные, T_{CM}, T_{EM} и T_{EMRA} и выявлено достоверное увеличение доли последних у пациентов с БП по сравнению с CMV-позитивными донорами. Более того, был проведен более подробный анализ доли терминально дифференцированных или «стареющих» клеток не только среди Т-лимфоцитов, но и среди НК и НКТ-подобных клеток. Однако, снижение доли «стареющих» клеток было выявлено только для Т-лимфоцитов у пациентов с БП по сравнению с CMV-позитивными донорами.

В целом, результаты описаны кратко, но с достаточно детальными подробностями и проиллюстрированы соответствующими рисунками. Полученные данные полностью представлены на графиках и в таблицах.

Научная новизна работы

В работе Вавиловой Ю.Д. было показано увеличение транскрипционной активности стресс-индуцируемых генов *HSPA*, кодирующих белки-шапероны Hsp70 в мононуклеарных клетках крови на фоне БП.

Впервые было обнаружено увеличение содержания основного белка аутофагии p62 в периферических мононуклеарах и выявлена положительная взаимосвязь между содержанием p62 в этих клетках и уровнем их спонтанного апоптоза. Выявлена диагностическая значимость комбинации уровня белка p62 и мРНК гена *HSPA6* для выявления БП.

Также в работе было установлено, что при БП снижается процентное содержание Т-клеток с признаками иммуностарения, а именно, терминально дифференцированных CD56⁻CD57⁺ Т-

лимфоцитов и доли эффекторных Т-клеток памяти, повторно экспрессирующих CD45RA (T_{EMRA}).

Значимость результатов для науки и практики

Научно-практическая значимость работы заключается в обнаружении потенциально перспективных периферических биомаркеров БП, использование которых в клинической практике может расширить существующие подходы в диагностике и анализе течения данного заболевания.

Также, стоит отметить, что обнаруженные в данной работе изменения в периферической иммунной системе на фоне БП может помочь определить направление дальнейших исследований аномалий периферической иммунной системы при нейродегенеративных заболеваниях.

Общая характеристика диссертационной работы

Диссертация написана по классическому плану, изложена на 100 страницах машинописного текста и содержит следующие разделы: список сокращений, введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и их обсуждения, заключение, выводы и список цитируемой литературы, включающего 209 ссылок. Диссертация содержит 22 рисунка и 6 таблиц.

Обзор литературы написан в хорошем стиле и детально описывает механизмы патогенеза БП, а также роль белков-шаперонов HSP70 и аутофагии при развитии БП. Отдельная глава посвящена уже известным в литературе биохимическим биомаркерам БП. Подробно описана роль системного и локального воспаления в патогенезе БП и описан феномен иммуностарения на фоне инфекции CMV при БП.

В главе «Материалы и методы» подробно изложены современные методы, использованные автором в работе, такие как проточная цитометрия, количественная ПЦР с обратной транскрипцией в режиме реального времени, иммуноферментный анализ, а также применение ROC-анализа для оценки диагностической значимости исследуемых параметров.

Материалы диссертации были представлены и обсуждены на 4 международных и 4 российских конференциях. Результаты исследования изложены в 4-х печатных работах, опубликованных в рецензируемых международных и российских журналах.

Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

Принципиальных замечаний по диссертации нет. Можно отметить некоторые технические недочеты. В частности, отсутствует единое обозначение цитомегаловируса: CMV в тексте, но на рисунке 15 ЦМВ. В некоторых местах обозначения субпопуляций Т-лимфоцитов T_{CM}, T_{EM} и T_{EMRA} встречаются без учета регистра. Отмеченные стилистические неточности не умаляют ценности диссертационной работы.

Заключение

Диссертационная работа Вавиловой Юлии Дмитриевны «Изменение популяционного состава и характеристик системы шаперон-зависимого гомеостаза у циркулирующих клеток иммунной системы при развитии болезни Паркинсона», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности «1.5.3. – Молекулярная биология» представляет собой законченную научно-квалификационную работу высокого уровня. Полученные в ходе работы результаты вносят значительный вклад в решение актуальных проблем современной иммунологии. В частности, было показано увеличение транскрипционной активности стресс-индуцированных генов *HSPA*, кодирующих белки-шапероны Hsp70 в мононуклеарных клетках крови при БП, впервые было обнаружено увеличение содержания основного белка аутофагии p62 в РВМС и выявлена положительная взаимосвязь между содержанием p62 в этих клетках и уровнем их спонтанного апоптоза, выявлена диагностическая значимость комбинации уровня белка p62 и мРНК гена *HSPA6* для выявления БП, установлено, что в периферической крови пациентов с БП снижено процентное содержание терминально дифференцированных CD56⁻CD57⁺ Т-лимфоцитов и доли эффекторных Т-клеток памяти, повторно экспрессирующих CD45RA (TEMRA).

Диссертационная работа Вавиловой Юлии Дмитриевны соответствует критериям (в том числе 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; 20.03.2021 г. № 426; 11.09.2021 №1539), а сам диссертант несомненно заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности "1.5.3 - Молекулярная биология."

