

## ОТЗЫВ ОППОНЕНТА

на диссертационную работу Вавиловой Юлии Дмитриевны «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 исследования

Диссертационное исследование Вавиловой Юлии Дмитриевны посвящено сравнительному анализу фенотипических изменений иммунных клеток периферической крови и системы их протеостаза у пациентов с болезнью Паркинсона (БП) для выявления значимых и стабильных показателей, с целью их возможного дальнейшего применения в диагностике БП на ранних стадиях. Основной проблемой при диагностике и терапии БП, является то, что наблюдаемые клинические симптомы БП, на основе которых ставится диагноз, проявляются, когда количество дефектных/потерянных дофаминергических нейронов достигает 60-80%. В связи с этим требуется разработка подходов к ранней диагностике БП и к наблюдению за развитием болезни у пациента. Таким образом, остается актуальной потребность в выявлении достоверных биомаркеров с высокой степенью чувствительности и специфичности с целью улучшения диагностики БП. Диагностика по параметрам крови и клеток иммунной системы представляется наиболее перспективной в виду малой инвазивности. Известно, что нейродегенерация головного мозга при БП связана с недостаточностью клеточного протеостаза, а именно, аутофагии, убиквитин-протеосомной системы или системы белков-шаперонов семейства 70 кДа (HSP70). На состояние клеток иммунной системы в крови оказывает огромное влияние наличие хронических инфекций, потому изучение зрелости и системы протеостаза различных популяций Т и NK клеток при инфекции CMV и без нее у пациентов и здоровых доноров является актуальной задачей. Комбинация биохимических маркеров клеточного протеостаза и состояние зрелости клеток иммунной системы могут послужить надежным маркером БП.

### Научная новизна работы и практическая ценность результатов

В работе Вавиловой Ю.Д. было показано увеличение транскрипционной активности стресс-индуцированных генов *HSPA*, кодирующих белки-шапероны Hsp70 в мононуклеарных клетках крови на фоне 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 Т-клеток с признаками иммуностарения, а именно, терминально дифференцированных CD56-CD57+ Т-лимфоцитов и доли эффекторных Т-клеток памяти, повторно экспрессирующих CD45RA (TEMRA).

Комбинация увеличения экспрессии гена *HSPA6* и внутриклеточного белка p62 в РВМС, может рассматриваться как потенциальный периферический биомаркер развития БП, использование которого в клинической практике может расширить существующие подходы в диагностике и анализе течения данного заболевания.

Обнаруженное снижение содержания Т-клеток с признаками иммуностарения в периферической крови пациентов с БП, может помочь определить направление дальнейших исследований аномалий как периферической иммунной системы, так и процессов в ЦНС, связанных с нейродегенеративными заболеваниями.

### Структура диссертационной работы



Диссертационная работа Вавиловой Ю.Д. изложена на 100 страницах и состоит из списка сокращений, введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка цитируемой литературы, включающего 209 ссылок и приложения. Диссертация содержит 22 рисунка и 6 таблиц.

### **Характеристика диссертации**

Во **Введении** обоснована актуальность темы диссертации, ее практическая значимость и новизна, сформулированы цель и задачи исследования, приведены положения, выносимые на защиту.

**Глава 1 «Обзор литературы»** состоит из пяти основных частей. Описаны симптомы и патогенез БП, а также участие альфа-синуклеина в развитии патологии. Во втором разделе представлена имеющаяся информация о роли белков-шаперонов HSP70 и аутофагии при развитии БП. В третьем разделе собрана информация об имеющихся биохимических биомаркерах периферической крови, обнаруженных у пациентов с БП. В четвертом разделе описана роль системного и локального воспаления в патогенезе БП. Пятый раздел посвящен описанию иммуностарения на фоне инфекции CMV при БП.

**Глава 2 «Материалы и методы»** содержит описание методов, использованных в исследовании. В диссертационном исследовании были использованы разнообразные методы клеточной, молекулярной биологии и биохимии. Материал изложен достаточно четко и дает представление об использованных подходах, есть возможность повторить описанные методики. Использованные автором методы современны и адекватны поставленным задачам.

**Глава 3 «Результаты»** содержит 8 разделов и описывает результаты проведенного диссертантом исследования. Внутриклеточный пул белков HSP70 был проанализирован в интактных РВМС пациентов с БП и в контрольной группе того же возраста, не страдающей БП – здоровые доноры (ЗД) с помощью проточной цитофлуориметрии. В когортах данного исследования не удалось выявить изменений содержания общего пула внутриклеточных шаперонов HSP70 в РВМС у пациентов с БП легкой и средней степени тяжести. Автором был проведен анализ базовой транскрипционной активности генов *HSPA*, кодирующих белки HSP70, в РВМС пациентов с БП и ЗД с использованием количественной ПЦР с обратной транскрипцией в режиме реального времени. Относительный уровень транскрипционной активности гена *HSPA8*, кодирующего конститутивный белок Hsc70, не отличался между группами пациентов с БП и здоровых доноров. Однако статистически значимое увеличение базальной транскрипционной активности гена *HSPA6* в РВМС наблюдалось у пациентов с БП по сравнению со здоровыми донорами. Также автор показал достоверное повышение внутриклеточного содержания белка p62 у пациентов с БП по сравнению с здоровыми донорами, что может свидетельствовать о регрессе аутофагического потока в РВМС при БП. Автор заключает, что комбинация внутриклеточного содержания белка p62 и мРНК гена *HSPA6*, измеренных в РВМС, может рассматриваться в виде потенциальных биомаркеров для различения БП на ранних/средних стадиях. В группах пациентов с БП и здоровых доноров была произведена оценка представленности Т-клеток на разных этапах дифференцировки. Не было обнаружено существенных различий в доле наивных (naïve) Т-клеток и различных субпопуляций Т-клеток памяти (TCM, TEM, TEMRA) между пациентами с БП и группой здоровых доноров. Однако, доля клеток TEMRA была статистически значимо снижена у пациентов с БП по сравнению с CMV-серопозитивными индивидами из группы здоровых доноров. Автором была проанализирована экспрессия маркера терминальной дифференцировки CD57 и рецептора NKG2C в субпопуляциях CD56<sup>-</sup> и CD56<sup>+</sup> Т-клеток и NK-клеток. Было показано, что индуцированное инфекцией CMV образование субпопуляций NK-клеток и Т-лимфоцитов, экспрессирующих NKG2C, не изменялось при БП. Ввиду того, что на долю CD57-экспрессирующих как Т-, так и NK-клеток может влиять возраст человека, в исследование была дополнительно включена группа молодых здоровых доноров.



В главе 4 «Обсуждение» автор обсуждает важность поддержания протеостаза для работы головного мозга и значимость его нарушений при БП. В разделе сжато резюмированы результаты, полученные в ходе работы. Автор интерпретирует полученные результаты через призму известных данных литературы. Автор дополнительно подчеркивает, что именно сочетание базальной транскрипционной активности HSPA6 и уровня белка p62 имеет потенциальное диагностическое значение при дифференциальной диагностике БП. Обсуждается потенциальная роль инфекции CMV на патогенез БП и влияние CMV на клетки иммунной системы. Автор выдвигает интересное предположение о том, что CD57+ Т-клетки у пациентов с БП также способны терять углеводный антиген CD57 и становиться CD57- Т-клетками.

В **Заключении** изложены полученные автором результаты и подчеркнута их значимость в контексте современного состояния проблемы.

**Выводы**, сделанные автором, соответствуют поставленным задачам.

Однако к диссертационной работе имеются следующие **замечания и вопросы**:

1. В литературе имеются свидетельства, указывающие на возможную ассоциацию БП с инфекционной нагрузкой таких распространенных патогенов как цитомегаловирус (CMV), вирус простого герпеса типа 1, *Chlamydomydia pneumoniae*, *Borrelia burgdorferi* и *Helicobacter pylori*. Проверяли пациентов и здоровых доноров, принимавших участие в исследовании, на эти патогены?
2. В тексте работы присутствуют опечатки, пунктуационные и стилистические ошибки. Особенно бросилась в глаза фраза «антитела против человека» на стр. 37. Ошибок не много, и они не мешают восприятию текста.
3. В тексте диссертации отсутствует ссылка на рисунок 3.
4. Сбита нумерация в разделе «Материалы и методы», пропущен пункт 2.1.
5. Не расшифровано обозначение «HD» на рисунке 7 и в таблице 3. Судя по всему имеются в виду «здоровые доноры».
6. На рисунке 9 в описание есть расшифровка обозначения «ns» но на рисунке такого обозначения нет.
7. На стр. 49 видимо ошибочно приведена ссылка на рисунок 6, по тексту скорее должна быть ссылка на рисунок 3.
8. На рисунке 10 приведены интересные данные по сравнению базальной экспрессии стресс-индуцированных генов HSPA1A, HSPA1B и HSPA6 в PBMC и PMN. Этот результат как и другие результаты, полученные на PMN стоило подробнее обсудить в работе, и объяснить возможные причины и последствия такого явления.
9. Известны ли статистические данные по заражению CMV среди пациентов с болезнью Паркинсона в российской популяции? Безусловно набрать достаточно представительные выборки пациентов всегда не просто. Автор в достаточной степени учла отсутствие группы CMV-негативных пациентов с БП. Однако наличие такой группы украсило бы исследование.

В целом диссертационная работа Вавиловой Ю.Д. выполнена на высоком научном и методическом уровне, и предъявляемые замечания никак не умаляют научной значимости проделанной работы.

### **Заключение**

Содержание работы отражено в 4 статьях, которые опубликованы в журналах, соответствующих Перечню ВАК России для опубликования основных научных результатов диссертации. Полученные автором данные представлены в виде докладов на 8 российских и международных конференциях.

Достоверность полученных автором результатов и сделанных на их основе выводов не оставляет сомнений. Положение автора в составе авторского коллектива в



опубликованных работах свидетельствует о личном вкладе диссертанта в выполненное исследование.

Автореферат диссертации полностью отражает основное содержание диссертации. Таким образом, диссертация Вавиловой Юлии Дмитриевны «Изменение популяционного состава и характеристик системы шаперон-зависимого гомеостаза у циркулирующих клеток иммунной системы при развитии болезни Паркинсона» является законченной оригинальной работой, научное и практическое значение которой в области молекулярной биологии не вызывает сомнений. По своему содержанию, уровню выполнения научных исследований, научной новизне и практической значимости полученных результатов диссертация полностью отвечает 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 ее автор Вавилова Юлия Дмитриевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 - Молекулярная биология.

Официальный оппонент:

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории клеточной биологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального Медико-биологического Агентства».

Лебедева Ольга Сергеевна

119435, г. Москва, Малая Пироговская ул., д. 1а,  
Тел. +7 (499) 246-44-09  
E-mail: [lebedevaolgasergeevna@gmail.com](mailto:lebedevaolgasergeevna@gmail.com)

Подпись к.б.н. Лебедевой О. С.

«Удостоверяю»

Ученый секретарь ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю. М. Лопухина ФМБА России  
к.б.н. Лихнова Ольга Петровна

«22»

мая

2023 г.

