

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора медицинских наук Литвиновой Ларисы Сергеевны на диссертацию Семенова Альберта Геннадьевича «Цитогенетическая нестабильность, нарушение баланса пролиферации и апоптоза лимфоцитов у больных иксодовым клещевым боррелиозом», представленную в диссертационный совет 24.1.187.01 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 3.3.3. Патологическая физиология

Актуальность темы исследования

На фоне значительных успехов в области профилактики, диагностики и лечения большинства инфекционных заболеваний проблема клещевых природно-очаговых инфекций далека до своего полного решения. Патогенез любого инфекционного заболевания, в том числе иксодового клещевого боррелиоза, представляет собой сложный динамический процесс, в ходе которого реализуется патогенный потенциал возбудителя во взаимодействии с факторами врождённого и адаптивного иммунитета организма. Частые случаи регистрации хронического течения иксодового клещевого боррелиоза, а также стертых форм заболевания с развитием отдаленных осложнений свидетельствуют о недостаточности научных знаний о проблеме взаимоотношений «патоген – макроорганизм». Установлено, что после перенесенной острой инфекции, боррелии способны длительно сохраняться в клетках системы мононуклеарных фагоцитов различных органов, из которых происходит повторная диссеминация возбудителя с развитием реактивно-аллергических реакций, составляющих патогенетическую основу хронического течения иксодового клещевого боррелиоза. При этом функциональная состоятельность и эффективное кооперативное взаимодействие антигенпредставляющих, регуляторных и эффекторных иммунных клеток в процессе противоборрелиозного иммунного ответа в значительной степени определяют не только возможность манифестации, но и варианты исходов инфекционного процесса.

В свете изложенного, актуальность темы диссертационной работы Семенова А.Г. с научно-практической точки зрения не вызывает сомнений, поскольку рецензируемое исследование посвящено изучению особенностей и закономерностей нарушений цитогенетического статуса, апоптотической и пролиферативной активности лимфоцитов крови у пациентов с разными клиническими вариантами иксодового клещевого боррелиоза, как теоретической основы для разработки подходов к профилактике его хронического течения.

Научная новизна основных выводов и результатов исследования

Представленная диссертационная работа характеризуется высокой степенью научной новизны. При изучении особенностей кариопатологических изменений и цитогенетических нарушений в лимфоцитах периферической крови у больных с манифестной формой иксодового клещевого боррелиоза Семеновым А.Г. впервые подробно охарактеризованы различные типы митотической патологии и хромосомных нарушений в лимфоцитах, свидетельствующих о цитогенетической нестабильности иммунокомпетентных клеток на фоне острой и хронической инфекции. В частности, автором установлено, что кариопатологические изменения лимфоцитов характеризуются повышением числа клеток с отставанием хромосом в различных фазах клеточного цикла. Наряду с этим у пациентов в острый период инфекции зарегистрировано повышение числа клеток с многогрупповой метафазой и с многополюсным митозом, лимфоцитов с микроядрами, полиплоидных и бинуклеарных клеток. Аналогичные изменения были зарегистрированы и у пациентов с хроническим боррелиозом. При этом относительное количество лимфоцитов с кариопикнозом и кариорексисом, которые являются косвенными признаками апоптоза, оказалось более высоким по сравнению с контрольными значениями только у пациентов с острой формой инфекции. Автор установил, что независимо от варианта течения инфекции, у больных повышается доля лимфоцитов с числовыми и структурными хромосомными aberrациями. Так, у пациентов с острым иксодовым клещевым боррелиозом была превышена частота хроматидных разрывов, среди которых преобладали хроматидные делеции и одиночные фрагменты, а также регистрировалось увеличение в среднем в 5 раз частоты хромосомных разрывов. Наряду с этим, у пациентов в острый период боррелиозной инфекции впервые был выявлен aberrантный кариотип с увеличением прицентромерного региона 9 пары гомологичных хромосом. При анализе пролиферативной и апоптотической активности лимфоцитов автором было впервые установлено, что независимо от варианта течения манифестной формы боррелиозной инфекции, регистрируется высокая, индуцированная боррелиозным корпускулярным антигеном, пролиферативная активность лимфоцитов крови в культуре *in vitro*. При этом усиление пролиферации клеток в острый период заболевания сочеталось с активацией их апоптоза, тогда как при хроническом варианте инфекции апоптотическая активность лимфоцитов была снижена. Сопоставив результаты оценки цитокиновой продукции в культуре мононуклеарных клеток, диссертант впервые установил, что изменения пролиферативной активности лимфоцитов (снижение антиген-неспецифической и повышение пролиферации, индуцированной антигеном боррелий), равно как и нарушения цитогенетического статуса, формируются на фоне гиперпродукции

провоспалительных цитокинов (IFN- γ , TNF- α , IL-6), что с одной стороны может свидетельствовать о сохранности механизмов межклеточной кооперации мононуклеарных лейкоцитов, а с другой, не исключает цитокин-опосредованных механизмов формирования структурно-функционального дисбаланса лимфоцитов.

В эксперименте Семеновым А.Г. было оценено влияние *B. garinii* на цитогенетический статус и активность апоптоза лимфоцитов в культуре *in vitro*. Автор обнаружил, что повышение концентрации *B. garinii* (были использованы концентрации 1:10, 1:20 и 1:50) приводило к увеличению частоты апоптотически погибших клеток по сравнению с интактным контролем, что свидетельствует о дозовой зависимости эффектов боррелий на иммунные клетки. Сходный эффект наблюдался и в отношении кариопатологических изменений и цитогенетических нарушений в лимфоцитах — увеличивалась частота патологических форм митоза, структурных и числовых aberrаций хромосом, аналогично таковым у пациентов в острый период заболевания.

Значимость результатов диссертационной работы для науки и практики

Полученные автором новые данные фундаментального характера позволяют по-новому взглянуть на механизмы формирования иммунного дисбаланса при острой и хронической боррелиозной инфекции. Результаты работы, свидетельствующие о кариопатологических изменениях, цитогенетических нарушениях, дисбалансе процессов пролиферации и апоптоза лимфоцитов при исходном клещевом боррелиозе, представляют не только научный интерес, но и практическую значимость. Выявленные изменения структурно-функционального гомеостаза лимфоцитов являются патогенетическими факторами острого и хронического инфекционного процесса и могут рассматриваться в качестве точек приложения для методов патогенетической терапии и профилактики хронического течения заболевания.

Выявленное автором цитопатическое влияние *B. garinii* на лимфоциты периферической крови, выражающееся в дозозависимой индукции апоптоза, хромосомных aberrаций и нарушении нормального хода митоза, определяет перспективы дальнейшей разработки темы настоящего исследования для изучения особенностей иммунопатогенеза боррелиозной инфекции в зависимости от вида и генотипа патогенных боррелий для диагностических, прогностических и терапевтических целей.

Результаты исследования Семенова А.Г. внедрены в учебный процесс кафедр патофизиологии, биологии и генетики, микробиологии и вирусологии, инфекционных болезней и эпидемиологии для студентов, обучающихся по специальностям лечебного и медико-биологического профилей.

Оценка содержания диссертации, ее завершенность

Структура диссертации традиционна. Работа изложена на 120 страницах, состоит из введения, 4 глав, выводов и списка литературы, включающего 224 источника (67 отечественных и 157 зарубежных). Диссертация иллюстрирована 14 таблицами и 12 рисунками.

Во введении обоснована актуальность темы исследования и степень ее разработанности, определены цель и задачи исследования, сформулирована научная новизна работы, фундаментальная и практическая значимость. Представлены основные положения работы, которые автор выносит на защиту. Цель работы сформулирована конкретно, задачи соответствуют поставленной цели.

В главе «Обзор литературы» приводятся современные данные о роли мононуклеарных лейкоцитов в патогенезе острой и хронической боррелиозной инфекции, о механизмах нарушения баланса пролиферации и апоптоза мононуклеарных лейкоцитов при инфекциях, о феномене и механизмах цитогенетической нестабильности при бактериальных инфекциях. Автор проанализировал большое количество источников, опираясь на которые, аргументирует актуальность и целесообразность изучения закономерностей карิโอпатологических изменений и нарушений цитогенетического статуса, апоптотической и пролиферативной активностей лимфоцитов крови у больных иксодовым клещевым боррелиозом.

В главе «Материал и методы исследования» приводится общая характеристика обследованных пациентов, описан материал и методы исследования. Для решения поставленных задач было проведено обследование 43 пациентов с манифестной формой иксодового клещевого боррелиоза, из которых 22 больных с острым течением инфекции (были обследованы в острый период и через 3 месяца после перенесённого заболевания) и 21 пациент с хроническим рецидивирующим течением боррелиоза. Контрольную группу составили 23 здоровых добровольца.

Материалом исследования служили мононуклеарные лейкоциты, полученные из венозной крови и супернатанты культуральной суспензии мононуклеарных лейкоцитов. В качестве индукторов пролиферативной, цитокинсекреторной и апоптотической активности клеток в культуре *in vitro* автор использовал классический митоген фитогемагглютинин и инактивированный корпускулярный антиген *B. garinii*. Дополнительно в экспериментах *in vitro* было исследовано влияние живых *B. garinii* на цитогенетический статус и апоптотическую активность лимфоцитов здоровых доноров. Интенсивность реакции бластной трансформации лимфоцитов, оценку карิโอпатологических изменений и хромосомный анализ лимфоцитов проводили в

процессе световой микроскопии, исследуя окрашенные рутинными и дифференциальными методами (техника G- и C-бэндов) препараты культивированных в разных условиях клеток. Для количественного определения лимфоцитов, находящихся на разных этапах клеточного цикла (предсинтетической G₀/G₁-фазе, синтетической S-фазе, предмитотической G₂/M-фазе, митотической M-фазе), а также клеток в состоянии апоптоза (суб-G₀/G₁-фаза), автор использовал метод двухцветной лазерной проточной цитометрии. Для определения концентрации цитокинов IL-4, IL-6, IFN- γ , TNF- α в супернатантах был использован метод твердофазного иммуноферментного анализа.

В главе «Результаты исследования» полученные данные представлены в виде 13 таблиц и 11 рисунков, в том числе с оригинальными микрофотографиями патологических вариантов митоза, структурных и числовых хромосомных aberrаций.

В главе «Обсуждение результатов» проведен подробный анализ полученных результатов и сопоставление их с данными литературы, что позволило диссертанту грамотно сформулировать выводы и положения, выносимые на защиту. Опираясь на собственные результаты и данные литературы, автор представил в 4 главе основные доказательства положений, выносимых на защиту, продемонстрировал в виде концептуальной схемы роль патогенетических факторов, характеризующих нарушения цитогенетического и функционального гомеостаза лейкоцитов периферической крови, в иммунопатогенезе боррелиозной инфекции.

Выводы научно обоснованы, вытекают из полученных автором результатов и полностью раскрывают поставленные задачи. Задач исследования решены полностью. Диссертационная работа оформлена в соответствии с требованиями ВАК, принципиальных замечаний по оформлению, содержанию и стилю изложения нет.

По теме диссертации опубликовано 32 научные работы, из них 3 статьи в ведущих рецензируемых журналах и изданиях, определенных ВАК для опубликования основных научных результатов по научной специальности 3.3.3. Патологическая физиология (биологические науки), 6 статей в ведущих рецензируемых журналах, представленных в российских и международных базах данных.

Достоверность выводов и положений, выносимых на защиту, личный вклад автора

Результаты диссертационного исследования Семенова А.Г. получены на достаточном количестве фактического материала. Задачи исследования решены полностью, выводы обоснованы и подтверждены фактическим материалом исследования. Достоверность полученных результатов обусловлена достаточным объемом исследуемых образцов, использованием современных методов, оборудования и реактивов. Основные

положения, выносимые на защиту, базируются на оценке и анализе результатов собственного исследования, доказаны с помощью методов статистического анализа.

Таким образом, достоверность результатов исследования, проведенного автором, не вызывает сомнений. Диссертационная работа по сути изучаемой проблемы соответствует паспорту специальности 3.3.3. Патологическая физиология.

Личный вклад автора состоит в определении цели работы и постановке задач, разработке дизайна исследования, самостоятельной пробоподготовке исследуемого материала и проведении лабораторных исследований, самостоятельном обобщении и интерпретации полученных результатов, написании статей и тезисов докладов.

Принципиальных замечаний к работе не имею, однако в ходе ознакомления с диссертацией возникли вопросы дискуссионного характера:

- 1) Известно, что ключевую роль в сохранении гомеостаза иммунной системы посредством поддержания баланса процессов гомеостатической пролиферации и апоптотической гибели клеток играет поддержание физиологических концентраций γ -цитокинов (IL-2, IL-7 и IL-15). Вы сосредоточили внимание на провоспалительных цитокинах IL-4, IL-6, IFN- γ , TNF- α . Чем обусловлен такой выбор и каковы механизмы их влияния на пролиферативную и апоптотическую активность лимфоцитов крови?
- 2) Согласно полученным Вами результатам, обсуждение аспектов работы касается исключительно лимфоцитов; в то же время, работа проводилась на мононуклеарных клетках крови, которые также включают примесь моноцитов. Логично предположить, что стимуляция ФГА и/или БАГ` будет приводить к запуску пролиферативной активности лимфоцитов, но некоторый вклад моноцитов также может иметь место. На Ваш взгляд, насколько значим вклад моноцитов в описываемые процессы?
- 3) Вами выдвинута «гипотеза о способности патогенных боррелий и их антигенов напрямую или опосредованно индуцировать повреждения хроматина, характеризующиеся, в том числе, нарушением морфологической структуры, и, вероятно, активности гетерохроматиновых участков прицентромерного района хромосомы 9». Как описанный Вами феномен влияет на течение заболевания и его хронизацию? На Ваш взгляд, есть ли субпопуляционная специфичность этого воздействия?
- 4) В рамках Вашего исследования выявлены некоторые различия в активности лимфоцитов при остром и при хроническом течении ИКБ. Теоретически, возможно ли использовать полученные различия для предотвращения хронизации ИКБ?

