

ОТЗЫВ

официального оппонента

д.м.н. О.В. Долгих

на диссертационную работу Данченко Ирины Юрьевны на тему «Оценка функции семафорина Sema4D/CD100 и его рецептора CD72 при ремиттирующем рассеянном склерозе», представленную на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям 14.01.11 – нервные болезни, 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология

Актуальность темы диссертационной работы. К настоящему времени достигнут существенный прогресс в оценке закономерностей развития рассеянного склероза и других демиелинизирующих заболеваний. Установлены возможные этиологические факторы рассеянного склероза и частично расшифрованы патогенетические механизмы их развития. Активное изучение патогенеза рассеянного склероза приводит к пониманию иммунопатологии воспаления и нейродегенеративного процесса, появлению и внедрению эффективных методов лечения этого тяжелого инвалидизирующего заболевания. Достижения экспериментальной неврологии и клинической иммунологии, активное внедрение в повседневную практику высокоинформативных инструментальных методов обследования, включая магнитно-резонансную томографию, позволили открыть новую эру в лечении этого заболевания, существенно улучшив прогноз пациентов.

От неврологов, занимающихся данной проблемой, требуются дополнительные знания в различных областях, включая сферу клинической иммунологии, необходимые для ранней дифференциальной диагностики и подбора индивидуальной терапии.

Диссертационная работа Данченко Ирины Юрьевны направлена на изучение функций представителя семейства семафоринов – молекулы Sema4D – в иммунной системе пациентов с ремиттирующим типом течения рассеянного склероза. Автором изучены также особенности экспрессии рецептора для данного семафорина в иммунной системе – CD72. Работа обладает безусловной актуальностью, так как выявленные в условиях адекватных лабораторных экспериментов аспекты иммунологии и патогенеза демиелинизирующего процесса при этом заболевании изучены впервые.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Выводы, представленные в диссертации, основаны на клиническом и лабораторном обследовании 52-х пациентов с достоверным диагнозом «Рассеянный склероз» согласно критериям МакДональда 2005 года, не имевших в анамнезе как факта получения какой-либо иммуномодулирующей

терапии, так и гормональной терапии на протяжении как минимум месяца до обследования. Подобный строгий отбор пациентов позволил автору получить адекватные и приемлемые для рассмотрения результаты научной работы. Группу контроля составили 24 условно здоровых донора. Обследование пациентов включало применение клинико-anamnestического метода, нейропсихологическое тестирование и лабораторную часть работы.

Представленные методы обследования пациентов и здоровых доноров адекватны поставленной в работе цели. Выводы диссертации соответствуют ее задачам.

Достоверность и новизна результатов исследования

Результаты диссертационного исследования подвергались статистической обработке с использованием непараметрических методов, что было приемлемо в данной работе и подтверждает достоверность полученных результатов.

Достоверность данного исследования подтверждается апробацией работы на конференциях различного уровня, совокупностью публикаций, в числе которых 7 представлены в изданиях, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ. Множество публикаций отражают иммунологические аспекты работы. В число изданий входит журнал «Бюллетень экспериментальной биологии и медицины», «Российский иммунологический журнал», «Доклады академии наук», представленные и в электронный ресурсах. Работа Данченко И.Ю. поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 14-04-96007) и Федеральной целевой программой Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине» (проект № 12-П-4-1019).

Практическая значимость результатов исследования

Диссертационная работа Данченко И.Ю. расшифровывает некоторые моменты патогенеза аутоиммунного воспаления и особенности взаимодействия Т- и В-лимфоцитов через Sema4D-CD72-зависимый сигнал.

В исследовании продемонстрирована повышенная экспрессия молекулы CD100 (Sema4D) на Т-лимфоцитах пациентов с ремиттирующим рассеянным склерозом и пониженная экспрессия рецептора CD72 на В-лимфоцитах. Используемые мембранные маркеры в качестве реактивов для исследования выбраны грамотно. Метод проточной цитометрии позволил автору оценивать особенности клеточных субпопуляций как у здоровых доноров, так и у пациентов с рассеянным склерозом, а также особенности экспрессии клеточных маркеров на поверхности лимфоцитов. С помощью установочных экспериментов были выбраны оптимальное время и вариант активации клеток. Примененный метод культивирования клеток, по мнению автора, отражал иммунный ответ на антиген, имеющий место в ходе патологических реакций при данном заболевании. И выявленные особенности исчезновения семафорина с мембраны Т-лимфоцитов при

длительном 18-часовом культивировании клеток предполагают возможность слияния семафорина с клеточной поверхностью с оказанием последующего действия, подобного демиелинизации. В целом, следует отметить, что предыдущие экспериментальные данные ученых эффективно использованы автором для расшифровки собственных лабораторных данных, полученных в ходе исследования.

Не меньший интерес вызывает исследование влияния блокады сигнала Sema4D с его рецептором на внутриклеточную продукцию CD19⁺ клетками цитокинов: фактора некроза опухоли-альфа, лимфотоксина-альфа и интерлейкина-10.

Арсенал примененных лабораторных исследований позволил автору предложить гипотетическую схему функционирования белковой молекулы семафорина Sema4D при взаимодействии с его рецептором CD72 в иммунной системе у здоровых доноров и пациентов с ремиттирующим типом течения рассеянного склероза. Дальнейшие предположения автора о возможных функциях семафорина в нервной системе оправдан и базируется на полученных на периферии, то есть в иммунной системе, лабораторных показателях.

Работу Данченко И.Ю. можно назвать фундаментальным исследованием, но ее практическое значение также не подвергается сомнению, так как она расширяет представление о новых молекулярных мишенях при терапии рассеянного склероза.

Общая оценка содержания диссертации и ее завершенности

Диссертация включает 175 страниц текста, построена по традиционному принципу, состоит из введения, 4 глав – обзора литературы, материалов и методов исследования, 2 глав собственных наблюдений, заключения, выводов и практических рекомендаций. Материал работы иллюстрирован 31 таблицей, 24 рисунками, включает 4 подробных клинических примера. Список цитируемой в диссертации литературы содержит 206 источников, включая 32 отечественных и 174 на иностранном языке.

Целью диссертационной работы явилось изучение значения экспрессии семафорина IV класса Sema4D (CD100) и рецептора для Sema4D, CD72, в иммунной системе для механизмов повреждения при рассеянном склерозе, а также роли Sema4D-CD72-зависимого сигнала в контроле функций иммунных клеток при данной патологии. Материалы и методы работы выстроены логично, включают все аспекты экспериментальной части работы. В рисунках отражены применяемые методы оценки лабораторных показателей. С помощью корреляционного анализа сопоставлены полученные клинические и иммунологические показатели.

Глава диссертационной работы «Оценка роли семафорина Sema4D/CD100 в контроле функции иммунокомпетентных клеток при

рассеянном склерозе» включает 6 подглав, 5 из которых посвящены результатам отдельных лабораторных исследований в условиях *ex vivo* и *in vitro* с использованием метода проточной цитометрии, а также метода иммуноферментного анализа. Подглавы выстроены логично, первоначально освещая экспрессию самого семафорина Sema4D на Т-лимфоцитах в условиях *ex vivo* и *in vitro* и уровень растворимого семафорина, а в дальнейшем касаясь экспрессии основного в иммунной системе рецептора для данного семафорина CD72 на В-лимфоцитах и оценки внутриклеточной продукции основных цитокинов на фоне блокады передачи сигнала с Sema4D на CD72. Необходимо признать, что все проведенные исследования, в особенности проточная цитометрия, обладают серьезным методическим уровнем. Весь алгоритм экспериментальной части работы выстроен оригинально и заслуживает положительной оценки. Автором использованы высококачественные реагенты в виде моноклональных антител к мембранным молекулам лимфоцитов и специализированного набора для иммуноферментного анализа.

В разделе заключения критически проанализированы ожидаемые и полученные в научной работе клинические и лабораторные данные. На основании проведенных исследований продемонстрирована гипотетическая схема вовлечения молекулы CD100 и рецептора для данного семафорина в иммунной системе CD72 в патогенез рассеянного склероза с ремиттирующим типом течения в сравнении с иммунной системой здоровых доноров.

Выводы исследования соответствуют его задачам, представлены полно и грамотно. Практические рекомендации базируются на результатах исследования. Положения, выносимые автором на защиту, и выводы диссертации отражают основные результаты работы. Достоверность полученных в диссертационной работе результатов сомнений не вызывает.

Диссертационная работа соответствует паспортам специальностей 14.01.11 – нервные болезни и 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология.

В автореферате отражено основное содержание диссертации. Принципиальных замечаний по оформлению автореферата нет.

В ходе знакомства с работой и оппонирования возникли следующие вопросы к автору:

1. Является ли растворимая форма семафорина его лигандом к рецепторной (мембранной) форме, запускающей специфичные для семафорина эффекты? Если да, то насколько CD100 можно отнести к лигандам для CD72, и не является ли тогда лигандом для CD72 растворимый сывороточный семафорин?

2. С какой целью идентифицировали присутствие семафорина не только на популяции CD3 клеток, но и на субпопуляциях Т-лимфоцитов?

Имеет ли значение различие в рецепции семафорина на CD4 и CD8 для семафоринопосредованного РС?

3. Почему определение растворимой формы семафорина проводили в плазме, а не в сыворотке крови?

4. Проводилось ли Вами оценка жизнеспособности клеток после 48-часовой их инкубации?

5. Можно ли утверждать, что количество контрастируемых очагов в головном мозге на 80% обусловлено опосредованным влиянием семафорина?

Следует подчеркнуть, что возникшие в ходе оппонирования вопросы не снижают научно-практическую значимость данной диссертационной работы.

**Заключение о соответствии диссертации критериям,
установленным Положением о порядке присуждения ученых степеней**


Диссертация Данченко Ирины Юрьевны «Оценка функции семафорина Sema4D/CD100 и его рецептора CD72 при ремиттирующем рассеянном склерозе» является завершенной научно-квалификационной работой, позволяющей решить одну из актуальных задач современной неврологии и клинической иммунологии – установление новых механизмов иммунопатогенеза рассеянного склероза. Работа Данченко И.Ю. имеет теоретическую и практическую значимость и соответствует пункту 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013г., предъявляемым к кандидатским диссертациям, а автор заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям 14.01.11 – нервные болезни и 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология.


Заведующий отделом иммунобиологических методов диагностики
ФБУН «ФНЦ медико-профилактических технологий управления
рисками здоровью населения»,

д.м.н.

Контактный телефон: +7 (342) 236-3930

Электронная почта: oleg@fcrisk.ru

 Олег Владимирович Долгих


Федеральное бюджетное учреждение науки  Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения

Адрес организации: г. Пермь, ул. Монастырская, 82

Телефон, факс (приемная, секретарь): 8(342)237-25-34

Веб-сайт: <http://fcrisk.ru>

Адрес электронной почты: oleg@fcrisk.ru, root@fcrisk.ru

Подпись О.В. Долгих заверяю
Начальник отдела кадров 



Л.Н. Гельфенбуйм

13.10.2015