

Федеральное государственное
бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ МОЗГА ЧЕЛОВЕКА
ИМ. Н.П. БЕХТЕРЕВОЙ
Российской академии наук
(ИМЧ РАН)
197376, Санкт-Петербург,
ул.Акад. Павлова, 9
Телефон: (812) 234-13-90
Факс: (812) 234-32-47
e-mail:office@ihb.spb.ru
ОГРН 1037828026587
ИНН 7813047417
№ 12408/
на № _____ от _____

«УТВЕРЖДАЮ»
Директор Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
Института мозга человека им. Н.П. Бехтерева
Российской академии наук
д.б.н., профессор, член-корр. РАН,
Медведев С.В.



СЕНТЯБРЯ 2015 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

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 и 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология

Актуальность темы исследования. Диссертационное исследование И.Ю. Данченко посвящено изучению функционирования белковой молекулы семафорина Sema4D (CD100) в иммунной системе пациентов с ремиттирующим течением рассеянного склероза. Актуальность изучения патогенеза рассеянного склероза связана с возникающей на его фоне ранней инвалидизацией лиц трудоспособного возраста и нерешенными проблемами понимания механизмов инициации и развития заболевания. Нейроиммунология является современным разделом клинической и экспериментальной иммунологии. Каскад патологических иммунных реакций при данном демиелинизирующем заболевании начинается, как правило, на периферии, поэтому изучение экспрессии молекул на клетках периферической крови по-прежнему информативно.

Накоплены экспериментальные данные, полученные преимущественно на животных моделях, о влиянии белковых молекул семафоринов на активацию микроглии, ингибирование миграции и дифференцировки клеток-предшественников олигодендроцитов и разрушение формирующих гематоэнцефалический барьер эндотелиальных соединений. Sema4D/CD100-дефицитные мыши испытывают нарушение продукции антител и устойчивы к развитию экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита. Повышенные уровни Sema4D/CD100 определяются на поверхности Т-лимфоцитов и в сыворотке крови мышей, склонных к спонтанному развитию различных аутоиммунных заболеваний, у человека – в ликворе при HTLV1-ассоциированной миелопатии, сопровождающейся также демиелинизацией. Растворимая форма Sema4D/CD100 вызывает *in vitro* апоптоз нейрональных предшественников и незрелых олигодендроцитов – клеток, играющих ключевую роль в миелинизации нервных волокон. Еще одним аргументом, обосновывающим целесообразность исследования роли Sema4D в патогенезе рассеянного склероза является тот факт, что рецептор для данного семафорина в иммунной системе, CD72, представлен преимущественно на В-лимфоцитах. Между тем, согласно современным представлениям, В-лимфоциты непосредственно

участвуют в развитии аутоиммунного воспаления при рассеянном склерозе, и истощение популяции этих клеток является одной из перспективных стратегий лечения данного заболевания. Следует отметить, что исследование экспрессии молекулы Sema4D и его рецептора на лимфоцитах человека ранее не проводилось, и поэтому функциональное значение этой молекулы для патогенеза рассеянного склероза не доказано.

Исходя из вышесказанного диссертационная работа И.Ю. Данченко представляет из себя актуальное, интересное, оригинальное исследование.

Степень обоснованности научных положений, выводов, практических рекомендаций. Для реализации цели диссертационной работы – изучения 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 – Данченко И.Ю. выделены 6 последовательных задач, решенных автором на высоком методическом уровне, с использованием современных методов исследования и статистической обработки данных. Необходимо отметить выбор в качестве основной группы из 52-х человек определенного и однородного контингента пациентов, ранее не получавших специфической иммуномодулирующей терапии и имеющих ремиттирующее течение заболевания, являющееся наиболее перспективным для выбора оптимальной терапии препаратами, изменяющими течение рассеянного склероза. Также автором грамотно и логично выстроен алгоритм лабораторных исследований, детально описанный и обоснованный, с пояснением целесообразности применяемого метода исследования. В работе использованы моноклональные антитела к мембранным молекулам лимфоцитов в качестве реагентов, что безусловно отражает современные тенденции диагностики и терапии аутоиммунных заболеваний. Исследование являлось одномоментным и контролируемым. Представлен анализ клинических данных, результатов психометрического и когнитивного тестирования «наивных» пациентов с ремиттирующим типом течения рассеянного склероза. В диссертационной работе приведен широкий алгоритм лабораторных исследований с применением современных методов – проточной цитометрии и иммуноферментного анализа. Статистическая обработка результатов корректно произведена с применением компьютерных программ в соответствии с требованиями к проведению статистического анализа. Тема диссертации Данченко Ирины Юрьевны «Оценка функции семафорина Sema4D/CD100 и его рецептора CD72 при ремиттирующем рассеянном склерозе» соответствует заявленным специальностям 14.01.11 – нервные болезни и 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология. Представленный объем клинико-лабораторных данных в сочетании с грамотно выбранным методом непараметрического статистического анализа позволяет считать полученные результаты достоверными.

Научная новизна. Впервые показано наличие повышенной экспрессии семафорина Sema4D/CD100 интактными Т-лимфоцитами в иммунной системе пациентов с ремиттирующим рассеянным склерозом, а также изменение ее уровня в

ответ на поликлональную активацию Т-лимфоцитов: повышение на начальных стадиях культивирования и снижение при длительном культивировании. Впервые обнаружено повышение экспрессии растворимой формы семафорина в плазме крови пациентов с рассеянным склерозом, а также в супернатантах Т-клеточных культур, полученных после культивирования Т-лимфоцитов. Произведена оценка экспрессии рецептора для Sema4D/CD100, CD72, В-лимфоцитами пациентов с рассеянным склерозом. Отмечено участие Sema4D-CD72-зависимого сигнала в регуляции функции этих клеток, в частности, продукции В-лимфоцитами основных про- и противовоспалительных цитокинов.

В процессе исследования выяснено, что повышение уровня экспрессии мембранной формы семафорина Sema4D/CD100 Т-лимфоцитами, уровня растворимого семафорина Sema4D в плазме крови, снижение экспрессии его рецептора CD72 В-лимфоцитами при рассеянном склерозе не зависит от стадии заболевания, его продолжительности, уровня инвалидизации пациентов. Не прослежено корреляций данных показателей с особенностями нейропсихологического профиля пациентов и результатами когнитивного тестирования с применением слухового теста на сложение в заданном темпе.

Одновременно с этим доказано, что вышеописанные иммунологические показатели участвуют в патогенезе рассеянного склероза, так как имеют корреляционные связи с клиническими характеристиками заболевания: с компонентами шкалы инвалидизации Курцке и показателями, косвенно отражающими воспалительный компонент заболевания (меньшей длительностью заболевания и активностью демиелинизирующего процесса по данным нейровизуализации).

Научно-практическая значимость диссертационной работы. Диссертационное исследование Данченко И.Ю. представляет не только теоретический интерес, но обладает научно-практической значимостью. При клинико-иммунологическом сопоставлении полученных в одномоментном контролируемом исследовании данных показано участие новых иммунных механизмов в каскаде патологических иммунных реакций при рассеянном склерозе. Результаты фундаментального исследования вовлеченности семафорина Sema4D/CD100 в патогенез заболевания являются основой для дальнейшего изучения данной молекулы в качестве возможной мишени при терапии ремиттирующего рассеянного склероза, что может служить основой для разработки новых терапевтических стратегий.

Рекомендации по дальнейшему использованию результатов работы в практической деятельности. Рекомендуется использовать результаты диссертационного исследования в практике врачей, занимающихся лечением пациентов с рассеянным склерозом в амбулаторных и стационарных условиях Российской Федерации. Выявленные в ходе научного исследования признаки гиперактивации В-лимфоцитарного звена иммунной системы обследованной группы пациентов с ремиттирующим рассеянным склерозом доказывает целесообразность включения в арсенал терапии препаратов, подавляющих функции В-клеток. Участие

семафорина Sema4D в воспалительных процессах при рассеянном склерозе обосновывает необходимость дальнейших исследований функционирования этой молекулы в иммунной системе в условиях патологии. Целесообразно использовать теоретические положения исследования в программах обучения на кафедрах неврологии и иммунологии профильных высших учебных заведений.

Общая характеристика работы. Диссертация оформлена в соответствии с общепринятыми требованиями, изложена на 175 страницах машинописного текста, иллюстрирована 31 таблицей, 24 рисунками, 4 подробными клиническими примерами, состоит из введения, обзора литературы, главы «Материалы и методы исследования», 2 глав собственных исследований, заключения, выводов и практических рекомендаций. Список литературы содержит 206 источников, в том числе 32 отечественных и 174 иностранных.

Работа построена по традиционному принципу, написана хорошим литературным языком, с последовательным и логичным изложением всего материала исследования. Автором раскрыта актуальность темы диссертации, четко сформулированы цель и задачи исследования, доказательно представлена научная новизна работы и ее научно-практическая значимость. Обзор литературы охватывает аспекты неврологии и иммунологии, состоит из 3-х подглав. В литературном обзоре даны современные представления об иммунопатогенезе рассеянного склероза и возможном месте семафорина Sema4D и его рецепторов в этом процессе. Подробно описаны предшествующие научные данные, полученные на животных моделях, о функциях семейства семафоринов в иммунной системе.

Автором дана клиническая характеристика пациентов, не получавших иммуномодулирующей терапии, а также описание их нейропсихологических особенностей и результатов когнитивного тестирования в сравнении со здоровыми донорами. В дальнейшем произведено сопоставление полученных клинических и иммунологических данных.

Экспериментальная часть работа выполнена с применением информативного метода оценки клеточных субпопуляций и экспрессии клеточных маркеров – проточной цитометрии. В диссертационной работе дано подробное описание пяти ключевых иммунологических исследований, доказывающих вовлечение Sema4D в патогенез рассеянного склероза, а именно: 1) экспрессии семафорина Sema4D/CD100 Т-лимфоцитами *ex vivo*; 2) экспрессии семафорина Sema4D/CD100 интактными и активированными Т-лимфоцитами (CD3⁺ клетками) *in vitro* (в культуре); 3) уровня растворимого семафорина в плазме крови и культуре Т-лимфоцитов (CD3⁺ клеток); 4) экспрессии рецептора для Sema4D/CD100 – CD72 – В-лимфоцитами (CD19⁺ клетками); 5) синтеза ключевых про- и противовоспалительных цитокинов В-лимфоцитами. Таким образом, автором предложен оригинальный алгоритм иммунологических исследований для уточнения функционирования молекулы CD100 в иммунной системе здоровых доноров и пациентов с ремиттирующим рассеянным склерозом.

В разделе «Заключение» представлены полученные диссертантом обобщенные данные и предложена гипотетическая схема вовлечения молекулы Sema4D (CD100) в патогенез ремиттирующего рассеянного склероза.

Выводы соответствуют поставленным задачам, практические рекомендации логично вытекают из полученных данных. Научные положения и выводы, представляемые в диссертации, имеют высокую степень обоснованности, достоверность полученных результатов сомнений не вызывает.

Автореферат соответствует содержанию диссертации и специальностям 14.01.11 – нервные болезни и 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология. Принципиальных замечаний по оформлению автореферата нет.

Основные результаты научного исследования Данченко И.Ю. отражены в 14 печатных работах, 7 из которых представлены в журналах, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ для размещения научных публикаций (включая «Вестник Уральской медицинской академической науки», «Российский иммунологический журнал», «Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова», «Бюллетень экспериментальной биологии и медицины», «Доклады академии наук»). Материалы диссертации были представлены на всероссийских и международных научных конференциях. Работа поддержана Федеральной целевой программой Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине» (проект № 12-П-4-1019) и грантом РФФИ (проект № 14-04-96007).

Автором выполнен достаточный объем работы, которую можно считать завершенной в рамках проводимого исследования.

Существенных замечаний по работе нет.

В качестве обсуждения считаем необходимым задать следующие вопросы автору:

1. Как Вы полагаете, будут ли иметь место отличия в терапевтическом воздействии анти-Sema4D-блокирующих антител, теоретическая целесообразность применения которых предположена в вашей научной работе, в сравнении с уже используемой на сегодняшний день в лечении пациентов с ремиттирующим рассеянным склерозом анти-V-клеточной терапией?


2. Можете ли Вы предположить причину отсутствия различий в изученных Вами показателях экспрессии мембранной и растворимой формы семафорина Sema4D у пациентов в стадии ремиссии и эксацербации рассеянного склероза?

Заключение. В работе решена научная задача неврологии и иммунологии – доказано участие ранее не исследованной белковой молекулы семафорина Sema4D в иммунопатогенезе рассеянного склероза и ее связи с клиническими характеристиками заболевания. Диссертационная работа Данченко И.Ю. является самостоятельным, завершенным научно-квалификационным исследованием и по актуальности, научной новизне, методическому уровню и научно-практической значимости полученных результатов полностью соответствует п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 года, а ее автор Данченко Ирина Юрьевна заслуживает присуждения искомой ученой степени

кандидата медицинских наук по специальностям 14.01.11 – нервные болезни и 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология.

Отзыв заслушан и одобрен на научном семинаре Лаборатории нейроиммунологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт мозга человека им. Н.П. Бехтеревой Российской академии наук (протокол № 6. от 28 сентября 2015 года).

Заведующий Лабораторией нейроиммунологии,
Руководитель Центра рассеянного склероза
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Институт мозга человека им. Н.П. Бехтеревой
Российской академии наук,
доктор медицинских наук, профессор


 Столяров Игорь Дмитриевич

Контакты составившего отзыв:

тел. +7(812)234-68-30

e-mail: sid@ihb.spb.ru

Старший научный сотрудник Лаборатории нейроиммунологии
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Институт мозга человека им. Н.П. Бехтеревой
Российской академии наук,
кандидат медицинских наук

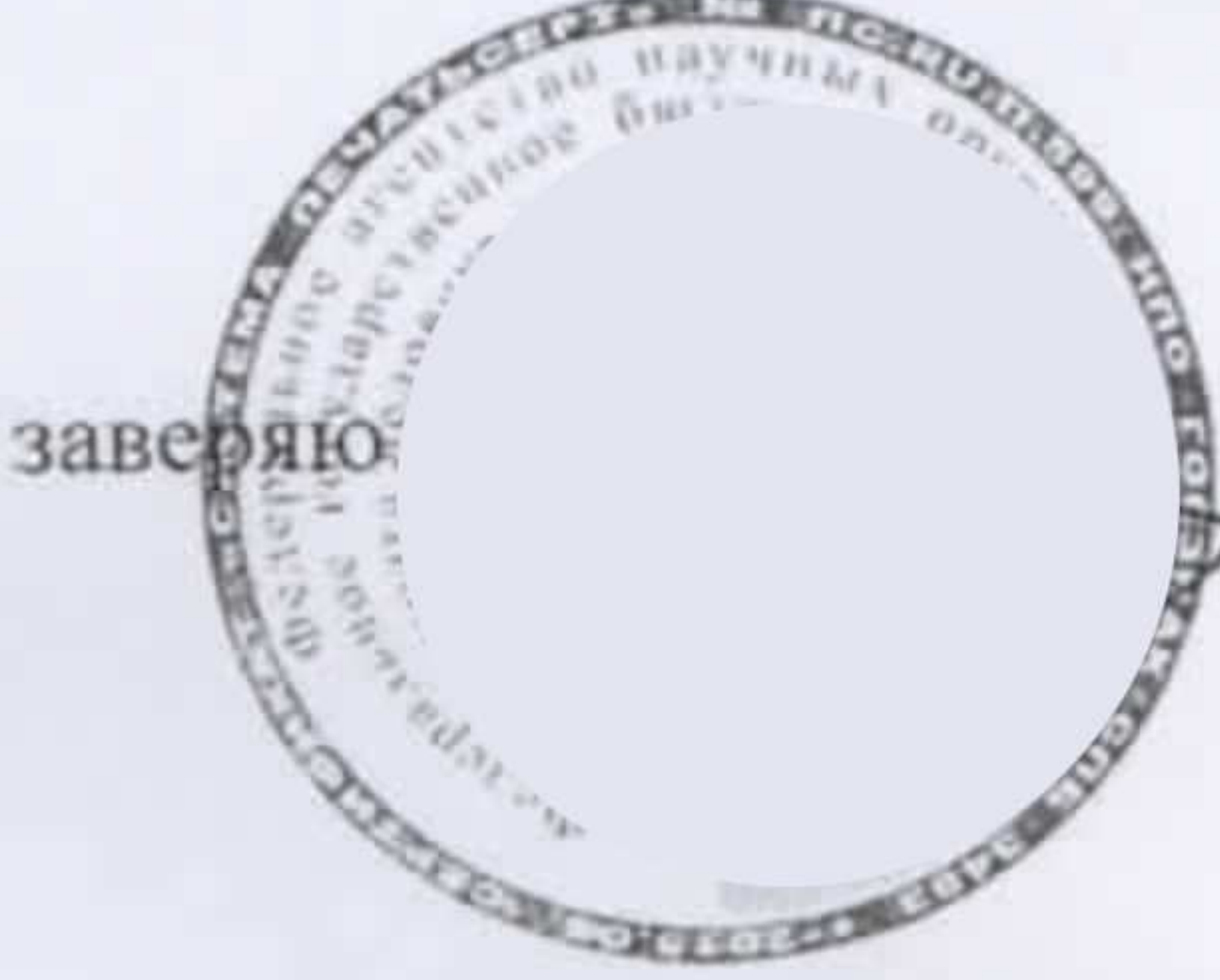
 Петров Андрей Михайлович

Контакты составившего отзыв:

тел. + +7(812)234-68-30

e-mail: apetrov@ihb.spb.ru

Подписи Столярова И.Д. и Петрова А.М. заверяю
Ученый секретарь ИМЧ РАН, к.м.н.
«29» сентября 2015г.

 Алексанян З.А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт мозга человека им. Н.П. Бехтеревой Российской академии наук
197376, Санкт-Петербург, ул. Акад. Павлова, д. 9,
веб-сайт: <http://www.ihb.spb.ru>
тел. +7(812)234-13-90, +7(812)234-94-76
e-mail: office@ihb.spb.ru