

## Отзыв официального оппонента

на диссертацию Терещенко Валерия Павловича

**«Индукция иммунологической толерантности с помощью дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкциями, кодирующими антигенные последовательности молекул МНС»,** представленную на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.09 – «Клиническая иммунология, аллергология»

В настоящее время для подавления трансплантационных реакций, таких как отторжение пересаженного органа или реакция «трансплантат против хозяина» (РТПХ), в клинике используется системная иммуносупрессивная терапия, обладающая множеством побочных эффектов, в том числе способная приводить к развитию различных оппортунистических инфекционных и онкологических заболеваний.

Диссертационная работа Терещенко В. П. посвящена актуальной проблеме разработки новых терапевтических подходов, направленных на антиген-специфическое подавление трансплантационных реакций, которые не обладают недостатками системной иммуносупрессивной. В работе Терещенко В.П. предложен способ активации иммунологической толерантности с помощью дендритных клеток (ДК), нагруженных плазмидной ДНК, кодирующей антигенные последовательности МНС класса I и/или иммуносупрессивный цитокин ИЛ-10. Работа выполнена на мышинных моделях *in vitro* и *in vivo*. В качестве способа доставки ДНК-конструкций автором был выбран метод электропорации, что, по моему мнению, является преимуществом перед другими способами трансфекции, поскольку электропорация может применяться в клинике без дополнительных исследований, что позволит разработанному в диссертации методу индукции иммунологической толерантности быстрее быть транслированным в клинику. Работа Терещенко В.П. несомненно обладает новизной, поскольку автором диссертации впервые были получены толерогенные ДК, нагруженные трансплантационными антигенами в виде ДНК-конструкций. Следует отметить, что выбор такого источника антигена является клинически обоснованным, поскольку не требует использования донорского материала. В результате проделанной работы было показано, что ДК мышцы, трансфицированные ДНК-конструкциями, кодирующими ИЛ-10, способны неспецифично индуцировать иммунологическую толерантность *in vitro* и подавлять такие иммунные реакции *in vivo*, как РТПХ и отторжение пересаженного кожного лоскута. С другой стороны, ДК мышцы, нагруженные ДНК-конструкциями, кодирующими антигенные последовательности аллогенных молекул МНС класса I, обуславливают *антиген-специфическое* подавление иммунных реакций *in vitro* и *in vivo*. Несомненно, два типа полученных толерогенных ДК должны работать с помощью различных механизмов, что и было продемонстрировано в диссертационной работе в модели реакции «трансплантат против хозяина» – было показано, что ДК, экспрессирующие ИЛ-10, способны подавлять цитотоксический иммунный ответ, тогда как ДК, презентующие антигенные последовательности аллогенных МНС, приводят к генерации Т-регуляторных клеток. Исследование проведено с использованием методов современной молекулярной биологии, клеточной биологии, иммунологии и экспериментальной медицины.

Диссертация построена по традиционному плану. После содержания и введения представлен подробный хорошо написанный литературный обзор, включающий в себя подробное описание механизмов поддержания иммунологической толерантности, иммунопатогенеза и современных подходов клеточной терапии трансплантационных реакций. Далее идет адекватная экспериментальная часть с описанием использованных в работе материалов и методов. Основной раздел – результаты, обсуждение результатов – занимает вместе с заключением и выводами около 40 страниц и содержит подробное описание результатов экспериментальной работы, включающих в себя оптимизацию условий получения толерогенных ДК, а также проверка иммуносупрессорных свойств полученных ДК в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. Работа достаточно хорошо проиллюстрирована рисунками и снабжена обширным списком литературы, включающим в себя более 250 источников. Статьи по теме диссертации, опубликованные в рецензируемых международных журналах, а также патент полностью отражают содержание работы. Здесь следует отметить, что представленный список основных опубликованных работ по теме диссертации содержит большое количество материалов зарубежных и российских конференций, которые я бы посоветовал в этот список не включать, поскольку тезисы не проходят процесс независимого рецензирования в отличие от статей в научных журналах.

В ходе рецензирования диссертационной работы Терещенко В.П. возникли следующие замечания и вопросы. Замечания и вопросы перечислены ниже в порядке появления:

1) В диссертационной работе для нагрузки ДК использовали антигенные последовательности молекул МНС класса I, однако к сожалению в названии работы этого не отражено.

2) Для более удобного восприятия материала о механизмах поддержания иммунологической толерантности и иммунопатологии трансплантационных реакций, содержащегося в литературном обзоре, не хватило обобщающих рисунков или схем. Кроме того, все три рисунка, представленные в Литературном обзоре, не переведены на русский язык.

3) В Литературном обзоре встречаются фрагменты текста на английском языке (например, на стр. 10).

4) В разделе Материалы и методы представлена диаграмма лишь одной плазмиды рМНС, кодирующей антигенные последовательности МНС, однако схемы плазмид рIL-10 и р(IL-10+МНС), также использованных в работе, не представлены, что значительно затрудняет интерпретацию результатов.

5) Рис. 6 на странице 46 содержит очень короткое описание, в котором не отражены встречающиеся на рисунке аббревиатуры (данных аббревиатур нет и в списке сокращений в конце диссертации).

6) Почему в экспериментальной части 3.4. не было проведено исследований толерогенных свойств ДК, трансфицированных двумя плазмидами рIL-10 и рМНС одновременно?

7) В связи с чем наблюдается значительное (пятикратное) снижение массы тимуса в контрольной группе, получавшей физиологический раствор, на 28-е сутки в модели острой РТПХ (Таблица 1)? Обоснован ли вывод о развитии РТПХ в экспериментальных группах по сравнению с таким контролем?

8) За счет чего ДК, трансфицированные антигенными последовательностями аллогенных МНС, и *не несущие толерогенного стимула*, способны индуцировать Т-регуляторные клетки? Терещенко В.П. в разделе объяснил этот феномен тем, что индукция Т-регуляторных клеток в данном случае связана с чужеродностью трансфицированных антигенных последовательностей и эпитопов в них закодированных. Однако для подтверждения этой гипотезы следовало ввести контрольную экспериментальную группу ДК, трансфицированных, например, ДНК-конструкциями, кодирующими EGFP или его фрагменты. В данном случае антигенная последовательность будет даже более чужеродной, чем фрагменты аллогенного МНС.

Указанные замечания носят рекомендательный характер и несколько не снижают актуальность, новизну, практическую значимость полученных результатов. Можно заключить, что диссертация Терещенко Валерия Павловича полностью соответствует требованиям, установленным пп. 9-14 «Положением о присуждении ученых степеней», утвержденным постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 №842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 №335; 02.08.2016 №748; 29.05.2017 № 650, а ее автор несомненно заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.09 – «Клиническая иммунология, аллергология».

11 ноября 2020 г.

Олег Владимирович Марков  
кандидат биологических наук по специальности 03.01.04 – Биохимия  
Научный сотрудник Лаборатории биохимии нуклеиновых кислот  
ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН  
630090, г. Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, д. 8, ИХБФМ СО РАН  
+7 383 363-51-61, markov\_oleg@list.ru

Личную подпись О.В. Маркова  
УДОСТОВЕРЯЮ



Пестряков Павел Ефимович  
Ученый секретарь  
ИХБФМ СО РАН,  
кандидат химических наук