

## ОТЗЫВ

официального оппонента Маркова Олега Владимировича  
на диссертационную работу Фишер Марины Сергеевны  
«Индукция антиген-специфической толерантности с помощью дендритных  
клеток, трансфицированных ДНК-конструкциями, при экспериментальном  
артрите», представленную на соискание учёной степени кандидата медицинских  
наук по специальности 3.2.7. Иммунология

### Актуальность темы

Диссертация Фишер Марины Сергеевны посвящена исследованию, направленному на изучение индукции иммунологической толерантности с использованием дендритных клеток (ДК), которые были модифицированы с помощью ДНК-конструкций, кодирующих IL-10, CCR9 и эпитопы коллагена II типа. Исследование проводилось *in vitro* и *in vivo* на модели антиген-коллаген-индуцированного артрита мышей.

Актуальность данной темы объясняется тем, что современные методы лечения аутоиммунных заболеваний имеют ряд существенных побочных эффектов, что вызывает необходимость поиска альтернативных подходов к терапии. Одной из перспективных стратегий лечения аутоиммунных заболеваний является использование толерогенных дендритных клеток (ДК). Использование неспецифических толерогенных ДК показало свою эффективность в клинических испытаниях, однако антиген-независимое действие данных клеток способствует более выраженной иммуносупрессии и, соответственно, может привести к развитию инфекционных и онкологических заболеваний. Многообещающей альтернативой является использование антиген-специфических толерогенных ДК, в том числе ДК, трансфицированных экзогенной ДНК, кодирующей несколько иммуногенных пептидов и регуляторных молекул. Данный подход может лечь в основу эффективной, безопасной и таргетной терапии для лечения аутоиммунных заболеваний. В связи с этим, исследование, проведенное Фишер Мариной Сергеевной, посвященное изучению толерогенных свойств ДК, трансфицированных ДНК-конструкциями, кодирующими антигенные, иммуносупрессивные и регуляторные факторы, несомненно обладает значительной актуальностью и практической значимостью.

### Степень обоснованности и достоверности научных положений и выводов

Работа представляет собой завершённое исследование. Проведённые исследования полностью соответствуют поставленной цели и задачам работы и выполнены в полном объёме.

Достоверность результатов работы, научные положения и выводы диссертации подтверждаются логично выстроенным алгоритмом работы, достаточной выборкой исследования, использованием современных иммунологических и молекулярно-биологических методов, адекватных методов статистической обработки, анализе и сопоставлении данных.

Положения, выносимые на защиту, полностью подтверждены результатами. Выводы диссертационной работы корректны, соответствуют поставленным задачам, логично вытекают из полученных результатов.

Основные положения диссертации доложены и обсуждены на российских и международных конференциях. Опубликовано 6 работ, в том числе 2 экспериментальные статьи и 1 обзорная статья в журналах, индексирующихся в базе Scopus и Web of Science и рекомендованных ВАК РФ.

### **Научная новизна и практическая значимость**

В работе впервые представлены данные о получении антиген-специфических ДК с использованием ДНК-конструкций, кодирующих IL-10, CCR9 и эпитопы коллагена II типа.

Впервые было показано, что трансфекция ДК плазмидной ДНК, кодирующей CCR9, повышает его экспрессию и увеличивает миграционную активность миелоидных дендритных клеток к тимическим клеткам *in vitro*. Продемонстрирована способность толерогенных ДК, трансфицированных ДНК-конструкциями, снижать активность антиген-коллаген индуцированного артрита у мышей *in vivo*. Таким образом, была доказана принципиальная возможность использования толерогенных ДК, трансфицированных ДНК-конструкциями, для антиген-специфического подавления активности аутоиммунных реакций.

Значимость работы заключается в характеристике толерогенных свойств антиген-специфических и неспецифических ДК и их сравнении, показана преобладающая эффективность именно антиген-специфических ДК при подавлении активности экспериментального артрита.

Материалы исследования могут иметь практическую значимость для восстановления иммунологической толерантности к аутоантигенам при аутоиммунных

заболеваниях. Активация миграции в тимус нагруженных антигеном ДК представляет вклад в формирование платформы технологий по индукции иммунологической толерантности при клеточной терапии аутоиммунных заболеваний.

### **Общая оценка диссертации**

Диссертационная работа имеет традиционную структуру, изложена на 106 страницах и включает главы: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы исследования», «Результаты собственных исследований», «Обсуждение результатов исследования», «Заключение», «Выводы», «Список сокращений», «Список литературы». Работа иллюстрирована 21 рисунками и 1 таблицей. «Список литературы» включает 170 источников.

Во введении автор формулирует цели и задачи своей работы, обосновывает актуальность исследования, оценивает научную новизну и потенциальную практическую значимость результатов, формулирует положения, выносимые на защиту.

Обзор литературы состоит из 3 подглав, содержит современные представления о методах терапии аутоиммунных заболеваний, основанных на мезенхимальных стромальных клетках, толерогенных ДК и Т-регуляторных клетках. В работе также описаны различные модели экспериментального артрита, применяемые для апробации разрабатываемых клеточных технологий. Глава хорошо проиллюстрирована рисунками. К большому сожалению, в Обзоре литературы недостаточно полно проведен анализ современного состояния области исследования, а именно методов получения толерогенных ДК (трансфекция ДНК и мРНК, нагрузка пептидами и белками, вирусная трансдукция и т.д.) и оценки эффективности их применения для коррекции аутоиммунных заболеваний в экспериментах *in vitro*, *in vivo* на мышинных моделях и в клинических испытаниях. Без данного раздела сложно оценить новизну исследования, выполненного в рамках представленной диссертационной работы, и ее вклад в общее развитие области исследования.

Глава «Материалы и методы исследования» написана подробно, представлены современные методы для анализа фенотипических и функциональных свойств исследуемых факторов и клеточных популяций. Все методы изложены подробно с описанием использованных расходных материалов. Выбор методов адекватен для решения поставленных цели и задач диссертационного исследования.

В главе «Результаты собственных исследований» автор последовательно описывает полученные в процессе работы данные, проводит их сравнительный анализ и сопоставления, делает обоснованные заключения.

В главе «Обсуждение результатов исследования» автор анализирует полученные результаты в контексте известных данных.

В главе «Заключение» автор подводит итог проведенных исследований.

Выводы основываются на фактически полученном автором материале и отражают суть проведенного диссертационного исследования.

Автореферат диссертации оформлен в соответствии с существующими требованиями, а его содержание соответствует данным, представленным в диссертации, и содержит основные результаты, необходимые для суждения об обоснованности выводов.

### **Вопросы и замечания**

Принципиальных замечаний к диссертационной работе нет. Во время прочтения диссертационной работы возник ряд вопросов и замечаний:

- 1) На Рис. 2 приводится русскоязычное написание цитокинов, тогда как в тексте диссертации и остальных рисунках название цитокинов дано на английском языке. Нужно привести названия цитокинов к единообразному написанию.
- 2) На стр. 22 рассказывается про «...использование противовоспалительных цитокинов, таких как IL-10, TGF- $\beta$  и IL-1 $\beta$ ...», тогда как IL-1 $\beta$  является провоспалительным цитокином.
- 3) В литературном обзоре отмечается значительная важность поиска оптимальных путей введения, а также определения количества инъекций толерогенных ДК для эффективного и продолжительного подавления аутоиммунных реакций. Почему в экспериментах, проведенных в рамках данной диссертационной работы, использовали лишь однократное внутривенное введение толерогенных ДК?
- 4) При оценке эффективности трансфекции дендритных клеток ДНК-конструкциями, кодирующими IL-10, CCR9 и Collagen II, Мариной Сергеевной проанализированы уровни экспрессии IL-10 (ELISA) и CCR9 (проточная цитометрия), однако почему не было проведено оценки уровня экспрессии эпитопов Collagen II в ДК?

- 5) В п.2.9 Материалов и методов не указано, как удаляли эритроциты при выделении спленоцитов. Использовали ли лизирующий буфер или центрифугировали клетки на подушке фиколла?
- 6) При рассмотрении экспериментальных групп, исследовавшихся в рамках диссертационной работы, возникают вопросы. Так, например, почему в исследованиях *in vivo* не использовали группы ДКрCCR9, ДКрСП, ДК(рCCR9+рIL-10) и ДК(рCCR9+СП)? Данные группы позволили бы определить вклад каждого из компонентов в общее толерогенное действие ДК. Кроме того, использование группы ДК(рCCR9+рIL-10) было бы не лишним в экспериментах по оценке пролиферативной активности CD4+ Т-лимфоцитов в присутствии толерогенных ДК. В тесте на миграционную активность толерогенных ДК к клеткам тимуса *in vitro* исследовали только группу ДКрCCR9, хотя дополнительные компоненты (IL-10, Collagen II) могут значительно повлиять на миграционную активность ДК.
- 7) В главе 4 «Обсуждение результатов исследования» CCR9 называют хемокином, хотя он является хемокиновым рецептором.
- 8) В главе 4 «Обсуждение результатов исследования» обсуждается задействование механизмов центральной толерантности при применении полученных толерогенных ДК. Однако для подтверждения этому необходимо привести экспериментальные данные, например по наличию толерогенных ДК в тимусе экспериментальных животных *in vivo* после их введения, покрасив их, например, прижизненными липидными трейсерами.
- 9) Стр. 80 – в тексте указано «...CCR7, который способствует миграции ДК к лимфатическим узлам, что и было показано в нашем эксперименте...». Однако такого эксперимента в рамках представленной диссертационной работы я не нашел.

### **Заключение**

Диссертационная работа Фишер Марины Сергеевны «Индукция антиген-специфической толерантности с помощью дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкциями, при экспериментальном артрите», представленная на соискание учёной степени кандидата медицинских наук по специальности 3.2.7. Иммунология, является самостоятельной завершённой научно-квалификационной работой, выполненной на высоком уровне и представляющей интерес для решения задач современной клеточной иммунотерапии аутоиммунных заболеваний. Диссертация

обладает внутренним единством, содержит новые научные результаты и положения, выдвигаемые для защиты, и выводы, которые свидетельствуют о личном вкладе автора в выполненную работу. Все замечания и вопросы, возникшие в ходе ознакомления с диссертационной работой Фишер Марины Сергеевны, носят уточняющий и рекомендательный характер и нисколько не умаляют научной и практической значимости исследовательской работы.

Диссертация Фишер М.С. соответствует требованиям пункта 9 «Положения о присуждении учёных степеней» (постановление Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года в редакции постановления Правительства РФ от октября 2018 г №1168), предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени кандидата наук, а ее автор заслуживает присуждения учёной степени кандидата медицинских наук по специальности 3.2.7. Иммунология.

Официальный оппонент:

научный сотрудник Лаборатории биохимии нуклеиновых кислот, Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук» (ИХБФМ СО РАН), кандидат биологических наук



Марков Олег Владимирович

Подпись кандидата биологических наук, Маркова Олега Владимировича заверяю:



Зам. директора  
по адм. и  
правам ИХБФМ СО РАН  
Р.С.

Адрес: 630090, г. Новосибирск, пр. Ак. Лаврентьева, 8  
тел. (383) 363-51-50  
e-mail: [niboch@niboch.nsc.ru](mailto:niboch@niboch.nsc.ru)  
Сайт: <http://www.niboch.nsc.ru/>

Дата

6 декабря 2024г.