

## **ОТЗЫВ**

официального оппонента, доктора медицинских наук, профессора, заведующего кафедрой клинической иммунологии и аллергологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации Сизякиной Людмилы Петровны на диссертацию Шнайдер Марии Александровны на тему: «Влияние модуляторов метилирования ДНК на свойства фибробластоподобных синовиальных клеток больных ревматоидным артритом *in vitro*», представленной к защите на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, по специальности 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология.

### **Актуальность темы исследования**

Рецензируемая работа посвящена актуальной теме – иммунопатогенезу ревматоидного артрита (РА), поиску новых клеток – мишеней и таргетных препаратов способных повысить эффективность современной терапии болезни. Клеточный состав воспаления в синовиальной оболочке при РА характеризуется разнородностью, описано несколько морфологических вариантов синовита. Общей чертой, характерной для всех субтипов синовита при РА, является активация и пролиферация фибробластоподобных синовиальных клеток (ФСК). ФСК – преобладающая популяция клеток в гиперплазированном ревматоидном синовии и в месте инвазии синовиальной оболочки в хрящевую и костную ткань. Данные последних лет указывают на то, что ФСК выполняют функции клеток врожденного иммунитета и могут быть первым типом клеток, реагирующим на аутоантиген при раннем или доклиническом РА. Показано, что ФСК играют ключевую роль в поддержании воспаления и деструкции суставов. Они являются основным источником провоспалительных медиаторов, металлопротеиназ, других биологически активных веществ, способствуют деструкции хрящевой и костной ткани, миграции и пролиферации в синовиальной оболочке



антигенпрезентирующих клеток, субпопуляций Т и В-лимфоцитов, нейтрофилов, NK - клеток, участвуют в ангиогенезе. Вовлеченность ФСК в патогенез РА на всех этапах заболевания, определяют перспективу поиска новых вмешательств, направленных на изменение фенотипа и функциональных свойств ФСК. Предполагается, что эффективных результатов можно достичь с помощью воздействия на эпигеном этих клеток. Показано, что ФСК больных РА *in vitro* характеризуются стабильным, возникающим *in vivo* фенотипом, обусловленным тотальным гипометилированием ДНК, сопоставимым по выраженности с гипометилированием ДНК в опухолевых клетках. Доклинические и клинические исследования, посвященные коррекции нарушений метилирования ДНК в ФСК больных РА единичны.

### **Научная новизна исследования и полученных результатов**

Научная новизна диссертации не вызывает сомнений. Впервые была охарактеризована способность ФСК больных РА в культуре *in vitro* спонтанно продуцировать провоспалительные и противовоспалительные цитокины, остеопротегерин, RANKL содержание которых существенно возрастает при стимуляции IL-1 $\beta$ . Впервые выявлено, что синтез ФСК провоспалительных цитокинов (IL – 6, IL – 17, IL – 18) снижался только при добавлении в культуры донатора метильных групп SAmе в определенных дозах. Деметилятор гидралазин практически не менял синтез цитокинов, а генистеин в некоторых дозах снижал продукцию IL-6 и IL-17. Модуляторы метилирования ДНК не влияли на продукцию клетками ФСК противовоспалительного цитокина IL-10, за исключением генистеина, внесение которого в культуры в средней дозировке снижал продукцию цитокина. Впервые показано, что метилирующие ДНК соединения - SAmе и генистеин снижают продукцию остеопротегерина и RANKL в культуре ФСК. Впервые выявлено, что SAmе усиливает синтез ФСК больных РА GM – CSF. Впервые установлено, что 40 – 45% ФСК больных РА в культуре



способны к миграции и инвазии, внесение в культуры метилирующих и деметилирующих соединений уменьшают их миграционную и инвазивную активность.

### **Степень обоснованности и достоверность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации**

Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и практических рекомендаций работы Шнайдер М. А. не вызывает сомнений. Изложенные в работе выводы и рекомендации основаны на глубоком анализе современной научной литературы, данных предшествующих исследований по теме диссертации, достаточном объеме экспериментального материала, полученного после операций эндопротезирования суставов. Автором проделана большая методическая работа по культивированию ФСК полученных из синовиальной оболочки больных с активным РА. Получение первичной культуры ФСК и ее поддержание в течение длительного времени – достаточно трудная задача, с которой автор успешно справился, один из первых в РФ. Полученные результаты подвергнуты современной статистической обработке с помощью программного пакета GraphPad Prism, версия 6. Научные положения, выводы и практические рекомендации полностью обоснованы и подтверждены результатами, полученными в ходе исследования.

### **Научная и практическая значимость полученных результатов**

Важным с научно-практических позиций в работе представляется заключение автора о том, что ФСК больных РА могут быть мишенью для таргетной терапии, а культура ФСК моделью доклинического скрининга новых лекарственных препаратов для лечения РА. Возможность эффективного скрининга новых препаратов показана автором на примере использования метилирующих агентов SAME и генистеина, обладающих противовоспалительными свойствами, снижающие процессы миграции и инвазии клеток.



## Содержание работы, ее завершенность и оформление

Диссертация изложена в традиционном стиле на 111 страницах машинописного текста и состоит из введения, 4 глав, выводов, списка литературы. Работа иллюстрирована 4 таблицами, 28 рисунками, 2 микрофотографиями. Список литературы включает 214 источников, из них 210 – зарубежных авторов. Во введении убедительно обосновывается актуальность исследований, указаны цель и задачи, научная новизна и научно-практическая значимость исследования, изложены основные положения, выносимые на защиту. Первая глава содержит анализ современной отечественной и зарубежной литературы. Цель представленной научной работы заключается в изучении провоспалительных свойств фибробластоподобных синовиальных клеток больных РА в культуре *in vitro*, их способности к миграции и инвазии и оценке эффективности коррекции выявленных изменений с помощью метилирующих и деметилирующих соединений. Для достижения поставленных целей автором поставлены и решены 4 задачи. Выносимые на защиту положения обосновывают концептуальную основу диссертации и состоят из 2 пунктов, сформулированных достаточно четко.

Обзор данных литературы представляет собой анализ проведенных исследований по теме диссертации. Автор изложил сведения о свойствах ФСК больных РА как потенциальных мишеней для избирательной терапии РА, акцентировав внимание на провоспалительные свойства клеток и возможностям новых методов лечения с помощью модуляторов метилирования ДНК. Обзор написан хорошим литературным языком, демонстрирует глубокое понимание автором проблемы участия ФСК в патогенезе РА, современных методов коррекции функции ФСК.

Во второй, третьей и четвертой главе представлены методы исследования, основные результаты исследования и их обсуждение. Методы исследования современны, изложены четко, их легко можно воспроизвести.



Главы собственных материалов диссертационной работы подразделяются на изложение результатов и их обсуждение. В главе 3 автором показано, что культуры ФСК больных РА *in vitro* обладают характерными морфологическими признаками, способны спонтанно и под воздействием стимуляции синтезировать в различных концентрациях про- и противовоспалительные цитокины, ростовой фактор GM-CSF, остеопротогерин, RANKL. Эти данные позволили автору сделать вывод о том, что выбранная модель, с определенными ограничениями, описывает изменения, которые происходят в синовиальной ткани больных РА и адекватна решению поставленных задач. Убедительно показано, что использованные в работе соединения, модулирующие метилирование ДНК в ФСК, обладают оппозитными свойствами: адеметионин и генистеин в различных дозах снижает продукцию медиаторов, гипометилатор гидралазин практически не оказывает влияние на свойства ФСК. Модуляторы метилирования ДНК не влияли на продукцию клетками ФСК противовоспалительного цитокина IL-10, за исключением генистеина, внесение которого в средней дозировке снижал продукцию цитокина. Добавление в культуры метилирующих соединений - SAME и генистеина приводило к статистически значимому снижению продукции OPG, RANKL, а внесение гидралазина не меняло синтез цитокинов. SAME, гидралазин и генистеин уменьшали миграционную и инвазивную способность ФСК больных РА. В разделе «Обсуждение результатов» проведено обобщение наиболее значимых результатов исследования, проведено их сравнение с результатами других исследований, касающихся освещаемых вопросов. Обращает внимание четкость и логический подход к представлению и анализу полученных данных. Выводы и рекомендации автора логично следуют из полученных результатов выполненного исследования и соответствуют поставленным задачам, основаны на достаточном количестве пациентов с РА, от которых был забран послеоперационный материал для последующего культивирования ФСК. Содержание автореферата полностью соответствует



основным положениям диссертации. В целом диссертация охватывает основные вопросы поставленной научной проблемы и соответствует критерию внутреннего единства, что подтверждается непротиворечивостью методологической базы, последовательностью в используемых приемах и методах анализа, концептуальностью и взаимосвязанностью выводов.

### **Полнота публикаций в печати**

Основное содержание диссертационного исследования достаточно полно отражено в 11 научных работах соискателя, в том числе в 4 статьях в журналах, рекомендованных ВАК, среди которых 1 публикация в изданиях WoS, 2 Scopus, 1 РИНЦ. Основные положения диссертации были доложены и обсуждены на Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Дни иммунологии в Сибири» (Новосибирск, 2015 г), на Объединённом иммунологическом форуме (Новосибирск, 2019 г).

### **Замечания по диссертационной работе**

Принципиальных замечаний по диссертационному исследованию нет. Автору указаны технически устранимые недочеты.

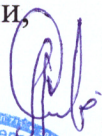
### **Заключение**

Диссертационная работа Шнайдер Марии Александровны на тему «Влияние модуляторов метилирования ДНК на свойства фибробластоподобных синовиальных клеток больных ревматоидным артритом *in vitro*», представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология является законченной научно-квалификационной работой, содержащей новое решение одной из актуальных научных задач клинической иммунологии – изучение патогенетической роли синовиальных фибробластов больных ревматоидным артритом и методов их эпигенетической коррекции.



Диссертация не содержит недостоверных сведений об опубликованных соискателем ученой степени работах, в которых изложены основные научные результаты диссертации, и полностью соответствует требованиям 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 (в редакции Постановления Правительства РФ от 11.09.2021 г. № 1539), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология.

Заведующий кафедрой клинической  
иммунологии и аллергологии  
ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России,  
доктор медицинских наук, профессор



Сизякина Людмила Петровна

« \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2022г.

Подпись Л.П. Сизякиной заверяю:  
Ученый секретарь ученого совета  
ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России,  
д.м.н., доцент



Н.Г.Сапронова

344022, Российская Федерация, Ростовская область, г.Ростов-на-Дону, переулок Нахичеванский,  
29. Тел. +7(863) 250-42-00, e-mail: okt@rostgmu.ru., msiziakina@mail.ru