

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального государственного
бюджетного научного учреждения
«Государственный научный центр
«Институт иммунологии» Федерального
медико-биологического агентства
д.м.н. профессор, член-корр. РАН

М. Р. Хаитов

« 28 » апреля 2025 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

о научно-практической значимости диссертационной работы Фишер Марины Сергеевны «Индукция антиген-специфической толерантности с помощью дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкциями, при экспериментальном артрите» на соискание учёной степени кандидата медицинских наук по специальности: 3.2.7. Иммунология

Актуальность темы диссертационной работы

В современных работах активно исследуются возможности новых инструментов, способных восстановить иммунную толерантность при различных заболеваниях.

Аутоиммунные заболевания представляют собой распространенную проблему в популяции, характеризующуюся утратой толерантности и активацией иммунного ответа против собственных антигенов, что приводит к повреждению клеток и тканей организма.

Существующие методы лечения аутоиммунных заболеваний имеют ряд существенных недостатков. Они оказывают неспецифическое иммуносупрессивное воздействие, что может вызывать серьезные побочные эффекты, такие как инфекционные и онкологические заболевания. Кроме того, не

всегда удается достичь стойкой ремиссии или улучшения состояния пациента. Эти недостатки подчеркивают необходимость поиска новых подходов к лечению, одним из которых является индукция иммунологической толерантности.

Одним из методов, способствующих восстановлению иммунологической толерантности, является подход с использованием толерогенных дендритных клеток. В данной работе изучаются эффекты антиген-специфических дендритных клеток, что позволяет избежать побочных эффектов, свойственных неспецифической иммуносупрессии.

Таким образом, исследование индукции антиген-специфической толерантности с помощью толерогенных дендритных клеток при аутоиммунных заболеваниях представляет собой актуальную задачу.

Соответствие темы диссертации указанной специальности

Тема диссертационной работы полностью соответствует специальности 3.2.7. Иммунология (Направления исследования: №6 Разработка и усовершенствование методов диагностики, лечения и профилактики инфекционных, аллергических и других иммунопатологических процессов. №7 Разработка способов воздействия на иммунную систему с помощью фармакологических препаратов и методов иммунобиотерапии. Исследование эффективности и безопасности этих воздействий).

Основные результаты диссертационной работы

В представленной работе был разработан протокол получения дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкциями, кодирующими IL-10, CCR9 и эпитопы коллагена II типа, обладающих толерогенным потенциалом, что подтверждается пониженным содержанием клеток с экспрессией маркеров зрелости CD80, CD86 и H-2Db, повышенной экспрессией CCR9, а также способностью к повышенной продукции IL-10.

Потенциал к подавлению аутоиммунных реакций полученными дендритными клетками проявлялся в их способности к генерации Т-регуляторных клеток, продукции IL-10 и TGF- β CD4⁺ лимфоцитами, и угнетении пролиферативной активности при их совместном культивировании. Причем был продемонстрирован разный характер подавления иммунных реакций. Группа ДКpIL-10 показала неспецифический иммуносупрессивный эффект, а группа ДКpIL-10+pCII+pCCR9, в свою очередь, антиген-специфическое подавление пролиферативной активности CD4⁺лимфоцитов в ответ на антиген. Уровень антиген-специфического подавления оказался более высоким, так как наблюдалось снижение пролиферативной активности до уровня группы контроля без добавления коллагена.

Продemonстрировано, что трансфекция дендритных клеток генетической конструкцией, кодирующей ген CCR9, приводит к повышению его экспрессии и увеличению миграционной активности миелоидных дендритных клеток к клеткам тимуса *in vitro*. CCR9⁺дендритные клетки способствуют индукции Т-регуляторных клеток при совместном культивировании с клетками тимуса.

Введение лабораторным животным с антиген-коллаген индуцированным артритом модифицированных толДК привело к снижению выраженности припухлости лап, уменьшению уровня антител к коллагену II типа и патологических изменений тканей суставов. Наиболее выраженный эффект наблюдался в группе ДКpCCR9+pCII+pIL10, где к 14 суткам после введения уже не обнаруживалось патологических изменений, а также снижался уровень антител к коллагену II типа. Группа ДКpIL-10 показала снижение выраженности припухлостей лап, что повлияло на припухлость лап лабораторных животных. При исследовании уровня антител к коллагену II типа в сыворотке, группа ДКpIL-10 не вызвала его снижение. Таким образом, группа ДКpIL-10 может оказывать ранний положительный эффект, но не способна сохранить его для купирования патологической реакции.

Таким образом, было показано, что дендритные клетки, трансфицированные ДНК-конструкциями, кодирующими эпитопы коллагена II типа, IL-10 и CCR9,

способствуют развитию антиген-специфической толерантности, контролируют воспаление и уменьшают тяжесть экспериментального артрита за счет исследованных механизмов: индукции Т-регуляторных клеток, IL-10, TGF- β .

Достоверность полученных результатов

Диссертационная работа Фишер М.С. представляет собой исследование, направленное на решение научной задачи, имеющей значение для развития иммунологии, которое включает тщательный анализ данных литературы, грамотное планирование экспериментов, применение современных методов. Данные получены на сертифицированном калиброванном оборудовании. В результате проведенных исследований был получен большой фактический материал, проведен его тщательный анализ и сопоставление с современными научными данными. Полученные экспериментальные данные обработаны с применением адекватных статистических методов и являются достоверными.

Научная новизна

Был разработан оригинальный протокол получения антиген-специфических толерогенных дендритных, при помощи трансфекции ДНК-конструкциями, кодирующими IL-10, CCR9 и эпитопы коллагена II типа.

Впервые была использована ДНК-конструкция, кодирующая CCR9, для трансфекции миелоидных дендритных клеток, изучена способность полученных клеток индуцировать Т-регуляторные клетки, и оценена миграционная активность к клеткам тимуса. Использование данной конструкции привело к повышению экспрессии CCR9, увеличению миграционной активности миелоидных дендритных клеток к клеткам тимуса, и продукции Т-регуляторных клеток *in vitro*.

Впервые было продемонстрировано, что совместное культивирование антиген-специфических Т-регуляторных клеток и CD4⁺спленоцитов (полученных от мышей с антиген-коллаген индуцированным артритом), приводит к

достоверному снижению пролиферативной активности CD4⁺T-клеток в ответ на антиген (коллаген II типа).

Впервые показана способность толерогенных дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкциями, кодирующими IL-10, CCR9 и эпитопы коллагена II типа, к подавлению активности антиген-коллаген индуцированного артрита у мышей.

Теоретическая значимость работы

В диссертационной работе продемонстрирована потенциальная возможность применения дендритных клеток, модифицированных с помощью ДНК-конструкций, для целенаправленного подавления активности аутоиммунных реакций. Этот метод представляет собой новый подход к созданию иммунологической толерантности при аутоиммунных заболеваниях. Представлены данные о получении антиген-специфических дендритных клеток, с использованием ДНК-конструкций, кодирующих IL-10, CCR9 и эпитопы коллагена II типа.

Ценность данной работы заключается в том, что она позволяет сравнить толерогенные свойства антиген-специфических и неспецифических дендритных клеток. Результаты показывают, что антиген-специфические дендритные клетки эффективно подавляют экспериментальный артрит у мышей. Полученные антиген-специфические дендритные клетки могут стать основой для создания клеточных вакцин для лечения аутоиммунных заболеваний.

Научно-практическая значимость работы

Диссертационная работа имеет высокую научно-практическую значимость. Данная работа представляет собой первое доклиническое исследование, в рамках которого был изучен метод индукции иммунологической толерантности, с помощью дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкциями,

кодирующими IL-10, CCR9 и эпитопы коллагена II типа, при экспериментальном артрите.

В ходе исследований разработан протокол получения антиген-специфических толерогенных дендритных, при помощи трансфекции ДНК-конструкциями. Проведение *in vitro* и *in vivo* экспериментов позволило оценить эффективность полученных клеток. Дендритные клетки, трансфицированные ДНК-конструкциями, кодирующими эпитопы коллагена II типа, IL-10 и CCR9, способствуют развитию антиген-специфической толерантности, контролируют воспаление и уменьшают тяжесть экспериментального артрита за счет исследованных механизмов: индукции Т-регуляторных клеток, IL-10, TGF- β .

В исследовании представлен подход, позволяющий модулировать иммунные реакции и воздействовать на аутоиммунные заболевания при помощи дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкциями.

Материалы, полученные в результате исследования, могут иметь практическую значимость для восстановления иммунологической толерантности к аутоантигенам при аутоиммунных заболеваниях. Активация миграции в тимус дендритных клеток, нагруженных антигеном, представляет важный вклад в формирование платформы технологий по индукции иммунологической толерантности при клеточной терапии аутоиммунных заболеваний.

Общая характеристика диссертационной работы

Диссертационная работа имеет традиционную структуру, изложена на 111 страницах машинописного текста и включает главы: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы исследования», «Результаты собственных исследований», «Обсуждение результатов исследования», «Заключение», «Выводы», «Список сокращений и условных обозначений», «Список литературы». Работа иллюстрирована 21 рисунками и 3 таблицами. «Список литературы» включает 176 источников.

В разделе «Введение» обоснована актуальность темы, аргументированы научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы. Содержание раздела «Обзор литературы» полностью соответствует теме диссертации, материалами обзора литературы обоснована необходимость проведения настоящего исследования. Полнота изложения материала подтверждает знание диссертантом современных научных данных по изучаемой проблематике. Глава «Материалы и методы» посвящена описанию использованных в работе методик. В материалах главы «Результаты» представлены результаты разработки подхода к получению толерогенных дендритных клеток, оценки эффективности применения данных клеток, описаны экспериментальные модели артрита, использованные в работе. В главе «Обсуждение» приведены результаты анализа полученных данных, проведено сопоставление их с имеющимися в настоящее время данными, опубликованными в мировой научной литературе. Выводы, основанные на результатах, обоснованы и четко сформулированы.

Материалы диссертации доложены на российских и международных конгрессах и конференциях. Основные результаты диссертации представлены в 6 печатных работах, в том числе 3 статей в научных журналах, которые включены в перечень рецензируемых периодических научных изданий, рекомендованных для опубликования основных научных результатов докторских и кандидатских диссертаций (названия журналов: «Иммунология», «Frontiers in Immunology»).

Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

Заключение

Диссертационная работа Фишер Марины Сергеевны «Индукция антиген-специфической толерантности с помощью дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкциями, при экспериментальном артрите» на соискание учёной степени кандидата медицинских наук по специальности: 3.2.7. Иммунология является научно-квалификационной работой, в которой решены актуальные задачи, имеющие существенное значение для иммунологии:

экспериментальном артрите и достигнуто полное отсутствие патологических гистологических изменений в тканях суставов на фоне применяемой клеточной терапии.

Диссертация полностью соответствует требованиям пункта 9 «Положения о присуждении ученых степеней» (постановление Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года в действующей редакции постановления Правительства РФ от 16 октября 2024 года №1382), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а её автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.2.7. Иммунология.

Отзыв заслушан, обсужден и утвержден на заседании секции Ученого совета Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства (протокол № 2 от 28.04. 2025 г.).

Отзыв составил:

Заведующий лабораторией иммунохимии ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, доктор биологических наук, профессор

Филатов Филатов Александр Васильевич

Дата: «28» апреля 2025 г.



Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства (ФГБУ ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России)

Адрес: 115522, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24

E-mail: info@ncii.ru

Тел: +7 499 612-81-38