

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора медицинских наук, Повещенко Ольги Владимировны, на диссертационную работу Шнайдер Марии Александровны «Влияние модуляторов метилирования ДНК на свойства фибробластоподобных синовиальных клеток больных ревматоидным артритом *in vitro*» на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности «14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология».

Актуальность темы диссертационного исследования

Актуальность темы исследования определяется значительным влиянием ревматоидного артрита (РА) на общество вследствие высокой распространенности (0,5%-2%) и частоты развития неблагоприятных исходов. РА является хроническим аутоиммунным заболеванием, характеризующимся поражением мелких суставов, ранним развитием инвалидности и повышенным риском сердечно-сосудистых заболеваний. Арсенал терапии РА в настоящее время представлен как классическими болезнью-модифицирующими препаратами (метотрексат, лефлуномид), так и разработанными в начале 21 века генно-инженерными ингибиторами TNF α и IL-6, низкомолекулярными блокаторами янус-киназ. Как неселективная, так и таргетная терапия РА позволяют добиться ремиссии и низкой активности болезни лишь у незначительной части больных. Большинство пациентов с течением времени прекращает прием генно-инженерных препаратов из-за отсутствия эффективности или побочных эффектов. Показано, что, несмотря на появление новых методов терапии, частота развития инвалидности и продолжительность жизни при РА остались прежними. В связи с этим очевидно, что поиск новых подходов к терапии РА является актуальной проблемой клинической иммунологии и ревматологии.

Перспективным направлением в терапии РА является воздействие на определенные типы клеток, участвующих в патогенезе. Активация и пролиферация фибробластоподобных синовиальных клеток (ФСК) в воспаленном синовии встречается у всех больных РА независимо от фенотипа заболевания. Традиционно ФСК больных РА отводилась роль эффекторов, опосредующих деструкцию хряща и костной ткани. Однако в последние годы показано, что ФСК обладают свойствами клеток врожденного иммунитета и играют ключевую роль в патогенезе РА уже на ранних этапах заболевания. Описан ряд уникальных особенностей ФСК при РА: автономность (относительная независимость от клеток иммунной системы), способность к инвазии и миграции в

интактные суставы. Эти свойства ФСК обуславливают хронический и полиартикулярный характер артрита. Стабильно измененный фенотип ФСК больных РА вызван эпигенетическими нарушениями, в том числе снижением метилирования ДНК. Исходя из этого, модуляция эпигенома ФСК может быть новой стратегией терапии РА.

Таким образом, изучение воздействия различных модуляторов метилирования ДНК на свойства ФСК больных РА несомненно является актуальной темой исследований.

Научная новизна исследования

В работе Шнайдер М.А. впервые установлено, что донатор метильных групп SAmе ингибирует синтез провоспалительных цитокинов (IL-6, IL-17, IL-18) в культурах ФСК больных РА. Впервые продемонстрировано влияние синтетических и растительных модуляторов метилирования ДНК на функционирование системы RANKL-OPG в культурах ФСК больных РА. Так, выявлено, что SAmе и генистеин уменьшают продукцию OPG и RANKL. Впервые показано, что SAmе увеличивает продукцию GM-CSF при добавлении в культуры ФСК больных РА. Впервые выявлено, что 40-45% ФСК больных РА обладают способностью к миграции и инвазии, а добавление SAmе, гидралазина и генистеина в культуры снижает миграционную и инвазивную активность ФСК.

Научно-практическая значимость исследований

Теоретическая значимость диссертационной работы Шнайдер М.А. заключается в получении новых знаний о патогенезе РА на основе оценки свойств ФСК, в частности, их способности к спонтанной и IL-1 β -стимулированной продукции провоспалительных цитокинов, остеопротегерина и RANKL. Продемонстрирована возможность коррекции выявленных патогенетических изменений после воздействия биофлаваноида генистеина и донатора метильной группы SAmе, одним из механизмов действия которых является влияние на метилирование ДНК. Полученные данные раскрывают новые механизмы развития стойких изменений фенотипа ФСК, обусловленных эпигенетическими нарушениями. Показана способность к миграции и инвазии у 45-50% ФСК. Установлено, что различные модуляторы метилирования ДНК уменьшают интенсивность миграции и инвазии ФСК.

Практическое значение работы заключается в оценке возможности использовать ФСК в качестве мишени для таргетной терапии РА, а культуры ФСК – как модель доклинического изучения новых лекарственных средств для терапии РА.

Достоверность и обоснованность научных положений и выводов, сформулированных в диссертации

Диссертация Шнайдер М.А. выполнена на высоком научном и методическом уровне. Проведенные исследования полностью соответствуют поставленной цели и задачам диссертации и выполнены в полном объеме. Достаточная выборка образцов синовиальной ткани больных РА, использование современных лабораторных методов и соответствующая поставленным задачам статистическая обработка свидетельствуют о достоверности и обоснованности полученных результатов. Все положения, выносимые на защиту, подтверждены полученными результатами. Выводы подтверждены фактическим материалом и отражают суть проведенных исследований. Следует отметить личное участие автора во всех этапах исследования. Научные положения и выводы, сформулированные в диссертации, представлены и обсуждены на научных конференциях. Основные результаты исследования опубликованы в 11 научных работах, в том числе в 4 статьях в журналах, рекомендованных ВАК.

Оценка содержания и завершенности диссертации

Диссертация написана в традиционном стиле и включает в себя введение, обзор данных литературы, материалы и методы, результаты собственных исследований, обсуждение полученных результатов, заключение и выводы. Материал диссертации изложен на 111 страницах машинописного текста, включающего 4 таблицы, 31 рисунок и 2 микрофотографии. Список литературы содержит 214 литературных источников, в том числе 210 иностранных.

Во введении обоснована актуальность избранной темы, степень ее разработанности, сформулированы цель и задачи исследования. Далее следует научная новизна и практическая значимость работы, основные положения, выносимые на защиту, результаты апробации материалов исследования, сведения о публикации основных материалов.

Литературный обзор написан грамотным литературным языком, хорошо и логично структурирован, свидетельствует о знании автором современной литературы, позволяет получить представление о состоянии проблемы, убеждает читателя в необходимости проведения данного исследования.

В разделе «Материалы и методы» автор подробно описывает методы культивирования, оценки продукции растворимых медиаторов, миграционной и

инвазивной способности ФСК больных РА. Необходимо отметить, что Шнайдер М.А. впервые в РФ отработала методику культивирования ФСК больных РА. Используемые методы и подходы современны, адекватны и позволяют достичь решения поставленных задач.

В разделе «Результаты» описана способность ФСК больных РА спонтанно и при стимуляции IL-1 β синтезировать ряд про- и противовоспалительных цитокины, GM-CSF, RANKL и остеопротегерин. Представлены данные экспериментов, оценивавших действие гидралазина, SAME и генистеина на продукцию цитокинов, систему RANKL-OPG, миграцию ФСК *in vitro*.

В главе «Обсуждение» проведено обоснованное сопоставление полученных результатов с данными литературы. Выводы и рекомендации подтверждены полученными результатами, обоснованы и соответствуют цели и задачам исследования.

Раздел «Заключение» посвящен подведению краткого итога проделанной работы.

Выводы работы полностью соответствуют представленным результатам.

В целом диссертация производит благоприятное впечатление, она оригинальна, высокотехнологична, конкретна, обладает внутренним единством, написана хорошим литературным языком. Работа достаточно хорошо иллюстрирована. Встречаются единичные опечатки и стилистические погрешности, но они не снижают значимости диссертации. Существенных замечаний, которые могли бы повлиять на научную ценность представленной работы, нет. Тем не менее, при ознакомлении с диссертацией возникли следующие вопросы уточняющего и дискуссионного характера:

1. Как возраст, пол, длительность заболевания, прием болезнь - модифицирующих препаратов влияют на метилирование ДНК ФСК?
2. Уровень метилирования ДНК определен в культурах ФСК от пациентов с РА. По данным литературы насколько выражено метилирование при ОА, у здоровых доноров?
3. Насколько гетерогенна была исследуемая популяция клеток, определялись ли МФ в ней?
4. ФСК находятся в тесной взаимосвязи с макрофагами, которая опосредована синтезом ряда биологически активных веществ, способствующих в том числе миграции. Уровень продукции цитокинов ФСК в культуре сопоставим с уровнем продукции МФ и других иммунных клеток?

5. Каково участие ФСК в патогенезе РА. Что первично в патогенезе – ФСК или иммунные клетки, стимуляция фибробластов провоспалительными цитокинами? Изменение метилирования - причина или следствие воспалительного процесса?

Автореферат в полной мере отражает содержание диссертации. Основные положения, выносимые на защиту, и результаты диссертационного исследования представлены в 11 научных работах, в том числе в 4 статьях в журналах, рекомендованных ВАК.

Диссертационная работа по своему содержанию полностью соответствует специальности 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология.

Заключение

Диссертационная работа Шнайдер Марии Александровны «Влияние модуляторов метилирования ДНК на свойства фибробластоподобных синовиальных клеток больных ревматоидным артритом *in vitro*» является законченной научно-квалификационной работой, в которой решены поставленные научные задачи, имеющие значение для клинической иммунологии: изучена способность ФСК больных РА к продукции ряда растворимых медиаторов, миграции и инвазии, оценено влияние синтетических и растительных модуляторов метилирования ДНК на свойства ФСК.

По своей актуальности, методическому уровню, научной новизне, теоретической и практической значимости, обоснованности научных выводов диссертационная работа Шнайдер М.А. полностью соответствует требованиям ВАК РФ к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук в п.9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 N 842 (ред. от 1.10.2018, с изм. от 26.05.2020). Автор достоин присуждения ему ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология.

Официальный оппонент,

заведующая лабораторией клеточных технологий

НИИКЭЛ – филиал ИЦиГ СО РАН,

доктор медицинских наук

Повещенко Ольга Владимировна

«_22_» __августа__2022 г

Подпись Повещенко Ольги Владимировны заверяю

Ученый секретарь

НИИКЭЛ – филиал ИЦиГ СО РАН, к.б.н.



Соловьева Анастасия Олеговна

Юридический и почтовый адрес:

Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (НИИКЭЛ – филиал ИЦиГ СО РАН)

630060, Новосибирская область, г. Новосибирск, ул. Тимакова, д.2

Электронная почта lymphology@niikel.ru

Сайт в интернете www.niikel.ru