

ОТЗЫВ

официального оппонента

на диссертацию Суздальцевой Юлии Геннадиевны на тему:
«Функциональная активность мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток человека различного генеза в условиях провоспалительного микроокружения» на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.22. – клеточная биология.

Актуальность избранной темы исследования

В настоящее время перспективы, связанные с реализацией технологий применения стволовых клеток в медицинской практике, являются самыми многообещающими, поскольку такой подход позволяет осуществить принципиально новые подходы к стимуляции регенеративных процессов в тканях при многих заболеваниях, для которых в настоящее время эффективных и специфических лекарственных средств не существует. Тем не менее, остается множество проблем, которые необходимо решить, чтобы эти технологии стали доступными для пациентов. Полноценная регенерация поврежденной ткани невозможна без участия клеток стромального дифферона, поскольку восстановление паренхимы происходит на создаваемом ими молекулярном каркасе. Поэтому мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК) в настоящее время рассматриваются как перспективное терапевтическое средство, поскольку могут быть прижизненно выделены из организма и успешно размножены *in vitro*. Сейчас установлено, что ММСК активно участвуют во всех фазах восстановления поврежденной ткани, благодаря своей способности динамично менять свой экспрессионно-секреторный профиль под влиянием микроокружения и выполнять в очаге воспаления регуляторную функцию. Фундаментальные исследования молекулярных механизмов регенерации тканей, вовлеченных в координацию сигнальных каскадов при взаимодействии стволовых клеток с другими клетками в очаге воспаления, на разных стадиях развития организма человека являются весьма актуальными и необходимы для успешной разработки лекарственных препаратов нового поколения.

Новизна исследования и полученных результатов, выводов, рекомендаций, сформулированных в диссертации

В рамках проведенной работы большое внимание было уделено сравнительным исследованиям морфофункциональных свойств ММСК, соответствующих разным стадиям развития человека, от эмбрионального периода до взрослого состояния. С помощью оригинального подхода, для реализации которого были разработаны методы двухстадийной дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) человека в мезодермальном направлении, получены клетки параксиальной мезодермы и ММСК взрослого человека из одного источника, отличающиеся по экспрессии мРНК транскрипционного фактора BRV, генов SNAI1, TBX6, MIXL1 и экспрессии поверхностных маркеров CD73 и CD105. Впервые установлено преимущество ММСК пуповины новорожденного перед ММСК взрослого человека, связанное с пропорционально более высоким содержанием прогениторных клеток, экспрессирующих нестин и рецептор фактора роста стволовых клеток (CD117), определяющих их регенераторный потенциал.

В диссертационной работе Ю.Г. Суздальцевой представлены новые данные о молекулярных механизмах индукции иммуномодулирующей активности ММСК в условиях провоспалительного микроокружения с участием растворимых факторов и межклеточных контактов. Впервые показано, что способность ММСК подавлять активацию моноклеарных клеток периферической крови сопровождается изменением цитокинового микроокружения, выражающегося в увеличении концентраций IL-1, IL-6, IFN- γ , G-CSF и снижении концентраций IL-10, IL-13 в супернатантах сокультур этих клеток. Автором впервые показано, что адгезионные контакты между ММСК и иммунными клетками играют важную роль регуляции функциональной активности ММСК в условиях воспаления. Установление межклеточных контактов происходит при взаимодействии рецепторных пар Т-клеточного интегрина LFA1 и ICAM-1 на ММСК, и Т-лимфоцитарного антигена 4 (CTLA4)/CD28 и костимуляторных молекул CD80/CD86 на ММСК. Эти адгезионные взаимодействия активируют

сигнальный каскад IFN- γ в клетках и образуют регуляторную петлю с положительной обратной связью, которая способствует затуханию воспалительной реакции за счет индукции синтеза IDO в ММСК. Установлено, что адгезионные взаимодействия между ММСК и иммунными клетками также важны в регуляции синтеза IL-1, IL-6 и G-CSF.

Научно-практическая значимость

Результаты, представленные в работе Суздальцевой Ю.Г., обладают научной и практической ценностью, так как способствуют лучшему пониманию общих закономерностей регуляции воспалительного ответа у человека в процессе развития, а также в норме и при патологии.

Полученные автором данные о высоком содержании прогениторных клеток в популяции культивируемых *ex vivo* ММСК пуповины новорожденного, а также об отсутствии клеточно-опосредованной цитотоксичности при взаимодействии ММСК человека с иммунокомпетентными клетками, являются фундаментальным обоснованием возможности терапевтического использования ММСК пуповины для аллогенных трансплантаций при заболеваниях, характеризующихся нарушениями процессов регенерации. В проведенных ограниченных клинических исследованиях были показаны эффективность и безопасность ММСК пуповины для лечения пациентов с хроническими ранами различной этиологии. Применение ММСК пуповины у таких пациентов приводило к стимуляции роста и созревания грануляционной ткани, улучшению микроциркуляции крови и ускорению эпителизации в раневом дефекте. Таким образом, в рамках настоящей работы было продемонстрировано, что ММСК способны стимулировать регенеративные процессы в тканях и смещать хронические воспалительные процессы в сторону заживления.

Результаты, полученные автором, могут быть использованы в дальнейших научных изысканиях и клинической практике, так как представленные в диссертации фундаментальными данными расширяют имеющиеся знания о возможности повышении терапевтической эффективности ММСК за счет предварительного праймирования их цитокинами, факторами роста, гипоксией и другими условиями

культивирования. Выявление повышенной секреции IL-1, IL-6, IL-8, IFN- γ , MCP-1 и G-CSF в совместных культурах ММСК и активированных иммунных клеток, позволяет выделить потенциальную область для поиска индукторов функциональной активности ММСК для разработки новых эффективных подходов к лечению заболеваний, характеризующихся развитием хронических воспалительных процессов.

Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Исследование закономерностей регуляции воспалительного процесса у человека с участием ММСК в норме и при патологии, а также в процессе развития было проведено с использованием системного подхода в моделях *in vitro* и клинических исследованиях с участием человека. Работа выполнена на большом количестве материала – культивируемых *ex vivo* ММСК костного мозга, жировой ткани, кожи взрослого человека, ММСК, выделенных из неонатальных тканей (пуповины новорожденного), а также мезодермальных предшественниках (клетках параксиальной мезодермы, полученных путем дифференцировки из ИПСК).

Для изучения молекулярных механизмов индукции функциональной активности ММСК человека в условиях провоспалительного микроокружения автор использовал комплекс современных методов, позволяющих в моделях *in vitro* описать процессы, происходящие при взаимодействии ММСК и иммунных клеток при воспалительных процессах в организме. Иммуномодулирующее влияние ММСК изучено в системе смешанных клеточных культур при сокультивировании с активированными иммунокомпетентными клетками в условиях контактного и бесконтактного взаимодействия. Молекулярные процессы в клетках, возникающие вследствие реципрокного взаимодействия ММСК и иммунных клеток идентифицированы и охарактеризованы с использованием методов проточной цитометрии, мультиплексного анализа, полимеразной цепной реакции, иммуногистохимии и микроскопии. На основании анализа полученных результатов сделан вывод о том, что IFN- γ и рецепторное взаимодействие HLA-DR и костимуляторных молекул CD80/CD86 на ММСК

с их контррецепторами на Т-лимфоцитах, индуцируя IDO в ММСК, образуют регуляторную петлю с положительной обратной связью, способствующую снижению активации и пролиферации активированных иммунных клеток и затуханию воспалительной реакции.

Иммуномодулирующая и противовоспалительная активность ММСК была подтверждена в результате ограниченных клинических исследованиях безопасности и эффективности препарата ММСК пуповины у пациентов с хроническими ранами различной этиологии. Для объективного анализа динамики раневого процесса у пациентов использованы методы планиметрии, лазерной доплеровской флоуметрии, измерения транскутанного напряжения кислорода тканей и шкала BWAT. В исследование было включено 108 больных, группы клеточной терапии и группе сравнения сформированы логично и адекватно, распределение больных по полу и возрасту в группах было сопоставимо и отражало структуру заболеваний, которые приводят к образованию длительно незаживающих язв и ран. Показано, что местное введение суспензии ММСК пуповины у пациентов с хроническими ранами стимулирует рост и созревание грануляционной ткани, вызывает улучшение микроциркуляции крови, создавая благоприятные условия для заживления ран или проведения аутодермопластики расщепленным лоскутом, не приводит к появлению нежелательных реакций местного и системного характера. На основании проведенных исследований сделан вывод о безопасности и эффективности суспензии ММСК пуповины в лечении хронических ран.

Полученные результаты подтверждаются адекватными параметрическими и непараметрическими методами статистического анализа. Проведено глубокое критическое сравнение собственных результатов исследования с данными современной научной литературы. Таким образом, учитывая объем материала и широкий спектр адекватных цели и задачам методов, достоверность и обоснованность полученных автором результатов и представленных выводов не вызывает сомнения.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

Полученные данные о повышении секреции IL-1, IL-6, IL-8, IFN- γ , MCP-1 и G-CSF в совместных культурах ММСК и активированных иммунных клеток следует учитывать при выборе индукторов, повышающих терапевтическую эффективность биомедицинских клеточных препаратов.

Выводы о безопасности и эффективности суспензии ММСК пуповины в лечении пациентов с хроническими ранами рекомендуется использовать для поиска перспективных подходов клеточной и лекарственной терапии при других заболеваниях, характеризующихся развитием хронических воспалительных процессов.

Личный вклад автора заключался в планировании, организации и проведении экспериментов, разработке методических подходов, систематизации и анализе полученных результатов, их адекватной статистической обработке, а также обобщении и сравнении их с данными современной литературы, подготовке публикаций.

Оценка содержания диссертации, ее завершенность

Диссертация написана по классической схеме и состоит из введения, обзора литературы, разделов материалы и методы, результаты исследования, их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Содержание диссертационной работы изложено последовательно, логично и аргументировано, содержит достаточное количество исходных данных. Диссертационный материал иллюстрирован таблицами, графиками, диаграммами, а также наглядными схемами. Диссертация представляет собой завершенный научный труд. Работа представляет собой концептуально оформленное исследование и производит благоприятное впечатление, благодаря обоснованности положений и выводов.

Основные положения работы достаточно полно изложены в 68 печатных работах, 20 научных статей из которых опубликованы в изданиях, рекомендуемых ВАК РФ, доложены на профильных конференциях и конгрессах. Автореферат диссертации по своему содержанию соответствует материалам, изложенным в тексте диссертации.

Принципиальных замечаний по рецензируемой работе нет. Однако хотелось бы указать на некоторые дискуссионные положения, имеющиеся в диссертации.

1. В настоящее время имеются убедительные доказательства того, что прекондиционирование IFN- γ усиливает иммуномодулирующие свойства и терапевтическую эффективность ММСК. В работе показано, что помимо IFN- γ в совместных культурах ММСК и активированных иммунных клеток происходит повышение уровня секреции IL-1, IL-6, IL-8, MCP-1 и G-CSF, что позволяет сделать вывод о возможности потенциального использования этих цитокинов в качестве индукторов функциональной активности ММСК. К сожалению, в работе отсутствуют обсуждение этого аспекта. Считаю, что работа только выиграла бы при обсуждении фундаментальных работ, касающихся проблемы разработки новых эффективных подходов к повышению терапевтической эффективности ММСК для лечения различных заболеваний.

2. В качестве вопроса хотелось бы узнать мнение автора: «Насколько возможно полученные в эксперименте факты о способности ММСК стимулировать процессы регенерации у пациентов с хроническими ранами экстраполировать на другие патологии, связанные с развитием хронических воспалительных процессов?»

Указанные замечания носят рекомендательный характер, их целесообразно учесть при дальнейшей работе по этому направлению, и они не влияют на общую положительную оценку представленного диссертационного исследования.

Заключение

Таким образом, диссертация Суздальцевой Юлии Геннадиевны является научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований разработаны теоретические положения о способности ММСК оказывать иммуномодулирующее и противовоспалительное действие, подтвержденные данными клинических исследований, совокупность которых можно квалифицировать как крупное научное достижение при решении проблем лечения длительно

незаживающих ран. Результаты проведенных исследований вносят вклад в понимание общих закономерностей регуляции ММСК иммунного и воспалительного ответа у человека, что может составить основу для разработки принципиально новых подходов к терапии заболеваний, характеризующихся развитием хронических воспалительных процессов. Результаты, представленные в диссертации, имеют большое значение для клеточной биологии, иммунологии, биохимии и физиологии.

По актуальности темы исследования, научному и методическому уровню, теоретической и практической значимости и достоверности полученных результатов диссертация Суздальцевой Юлии Геннадиевны соответствует требованиям пп.9 - 14 «Положения о присуждении ученых степеней» ВАК Минобрнауки РФ (Постановление Правительства РФ от 24.09.2013 г. №842 в редакции от 28.08.2017 №1024), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.22. – клеточная биология, а ее автор заслуживает присуждения искомой ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.22. – клеточная биология.

Доктор биологических наук (по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология и гистология), профессор, заведующий лабораторией генетики стволовых клеток Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова»
115522, Москва, ул. Москворечье, дом 1,
Тел.: +7 (499) 324-20-24
email: dvgoldrm7@gmail.com

Дмитрий Вадимович
Гольдштейн

07.11.2022

Подпись Гольдштейна Д.В. заверяю

Ученый секретарь, к.м.н.

Е.С. Воронина

