

## **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 темы исследования**

Исследования последних десятилетий значительно расширили наши представления об участии клеток стромального дифферона в восстановлении поврежденных тканей. Было установлено, что важную роль в этом процессе играют мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК), которые в настоящее время рассматриваются как перспективное терапевтическое средство для лечения заболеваний, связанных с нарушениями регенерации, поскольку они могут быть прижизненно выделены из различных тканевых источников и успешно размножены *in vitro*. Известно, что ММСК обладают способностью к направленной миграции в очаг повреждения, множественными паракринными эффектами, выраженными иммуносупрессивными свойствами, значительным дифференцировочным потенциалом. Факторы, секретируемые ММСК в ответ на воздействие провоспалительного микроокружения, вызывают функциональные изменения иммунных клеток и координируют баланс между провоспалительными и противовоспалительными факторами, создавая условия, необходимые для успешного заживления поврежденных тканей. Определение ключевых факторов, обеспечивающих успешное восстановление поврежденных тканей, является важным шагом в понимании механизмов регенерации органов и тканей в норме, а также в условиях ее нарушения. Таким образом,

фундаментальные исследования молекулярных механизмов, вовлеченных в координацию сигнальных каскадов при взаимодействии ММСК с другими клетками в очаге воспаления, являются весьма актуальными, позволяющими осуществить кардинально новые подходы к коррекции патологических процессов при многих заболеваниях, для которых на современном этапе не существует адекватных и специфических методов лечения.

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

Данная работа посвящена изучению возможных факторов и условий, активирующих альтернативные сигнальные каскады в ММСК, и определяющих функциональный статус ММСК в провоспалительном микроокружении. В работе детально изучено участие цитокинов IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$  в индукции синтеза и функциональной активности основных медиаторов воспаления (ферментов IDO, COX-2 и iNOS) в ММСК. Автором впервые показано, что активация иммунных клеток приводит к усилению их способности образовывать плотные межклеточные контакты с ММСК. При этом с помощью комплексного подхода к анализу субпопуляций иммунных клеток было установлено, что такая способность связываться с ММСК при активации обеспечивается субпопуляцией CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов. В тоже время у CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов такая способность не изменяется, а в субпопуляции CD45<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> лимфоцитов (не Т- лимфоцитов) снижается. Впервые продемонстрировано, что в ММСК за счет контактных взаимодействий с иммунными клетками осуществляется перекрестная регуляция экспрессии IDO через связывание рецепторных пар CD80/CD86 и ICAM-1 на поверхности ММСК и Т-клеточных LFA1 и CTLA4/CD28 соответственно. Обнаружено, что адгезионные контакты между ММСК и иммунными клетками участвуют в регуляции синтеза IL-1, IL-6 и G-CSF.



В модели *in vitro* установлено, что ММСК способны модулировать цитокиновое микроокружение. В системе смешанных культур с активированными моноклеарными клетками периферической крови впервые выявлено, что подавление пролиферации активированных CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, опосредованное ММСК, сопровождается увеличением концентраций интерлейкинов IL-1, IL-6, IFN- $\gamma$ , G-CSF и снижением концентраций IL-10, IL-13.

Иммуномодулирующее и противовоспалительное действие ММСК подтверждено результатами проведенного рандомизированного плацебо-контролируемого ограниченного пилотного исследования с участием пациентов с хроническими ранами различной этиологии. Впервые установлено, что введение суспензии ММСК по периферии раны и в дно раневого дефекта способно стимулировать процессы регенерации и смещать хронический воспалительный процесс в следующую фазу регенеративного процесса (фазу грануляции), что создает благоприятные условия для естественного заживления или проведения аутодермопластики расщепленным лоскутом.

В работе предложен оригинальный подход, ранее не использовавшийся в мировой практике, к изучению молекулярных механизмов регенерации тканей на различных стадиях развития организма с использованием клеточных моделей мезодермальных предшественников, дифференцированных из ИПСК,

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

Автором проделана большая экспериментальная работа, представлены убедительные данные, подтверждающие участие ММСК в регуляции воспалительных процессов в моделях *in vitro* и клинических исследованиях с участием человека. Комплексный подход с адекватным использованием современных методов, который автор использовал в этой работе, позволил

установить эффекторные пути в ММСК, которые регулируются провоспалительным микроокружением. Установлено, что активация сигнального пути IFN- $\gamma$  сопровождается индукцией синтезаIDO в ММСК и напрямую связана с подавлением активации и пролиферации иммуннокомпетентных клеток. Обнаружено также, что регуляция синтезаIDO в ММСК осуществляется за счет рецепторного взаимодействия костимуляторных молекул

CD80/CD86 и молекулы адгезии ICAM-1 на поверхности ММСК с их контррецепторами на Т-лимфоцитах. При подробном изучении цитокинового микроокружения показано увеличение концентраций IL-1, IL-6, IFN- $\gamma$ , G-CSF, сопровождающего супрессивный эффект ММСК по отношению к иммунным клеткам. Таким образом, установлены ключевые молекулы, участвующие в регуляции иммуномодулирующей активности ММСК. Научные результаты, свидетельствующих о ранее неизвестной фундаментальной роли этих белков в индукции функциональной активности ММСК позволили автору теоретически обосновать использование антагонистов молекулы адгезии ICAM-1 для мобилизации эндогенных ММСК у пациентов, а также применении IL-1, IL-6, IFN- $\gamma$ , G-CSF или их комбинаций для прекондиционирования ММСК для усиления иммуномодуляторных свойств перед трансплантацией.

Способность ММСК проявлять иммуномодулирующую и противовоспалительную активность была подтверждена также в плацебо-контролируемых клинических исследованиях с участием 108 пациентов с хроническими ранами различной этиологии, которые были рандомизированы в группу клеточной терапии и группу сравнения, сопоставимых по полу, возрасту и структуре заболеваний. Показано, что локальное введение в область раневого дефекта ММСК пуповины стимулирует рост грануляционной ткани и улучшает параметры микроциркуляции крови, формируя благоприятные условия для заживления. Тем самым фундаментально и практически подтверждена гипотеза о том, что ММСК обладают способностью динамично менять экспрессионно-



секреторный профиль в зависимости от микроокружения и выполнять регуляторную функцию в очаге повреждения.

Обоснованность положений и выводов диссертации подтверждается компетентной постановкой исследовательской проблемы, целью и совокупностью решаемых задач по ее достижению. Достоверность положений и выводов, изложенных в диссертации, обеспечивается использованием современных методов исследования, адекватными и корректными методами статистического анализа, а также проведенным критическим сравнительным анализом собственных результатов со значительным числом современных отечественных и зарубежных публикаций. Таким образом, достоверность и обоснованность полученных автором результатов и представленных выводов не вызывает сомнения.

### **Значимость для науки и практики полученных автором результатов**

Научная значимость проведенного исследования заключается в углублении и расширении знаний, касающихся идентификации молекулярных механизмов, задействованных в регуляции воспалительного ответа у человека. Определение IFN- $\gamma$  как критического фактора, участвующего в инициации и регуляции внутриклеточного сигнального каскада IDO в ММСК, имеет высокую практическую ценность, так как позволяет предложить новый адекватный способ повышения регенеративного потенциала ММСК, заключающийся в прекондиционировании ММСК IFN- $\gamma$  перед трансплантацией.

Практическая значимость работы заключается в возможности использования результатов исследования для решения задач прикладной медицины. Выраженные иммуномодулирующие свойства обуславливают возможность использования ММСК в терапии заболеваний, характеризующихся развитием хронических воспалительных процессов, и

которые в совокупности представляют собой ведущие причины инвалидности и смертности во всем мире. В данной работе были проведены ограниченные клинические исследования безопасности и эффективности ММСК у пациентов с хроническими ранами различной этиологии, лечение которых представляет собой сложную медицинскую проблему. Показано, что применение ММСК пуповины у таких пациентов не вызывает нежелательных побочных эффектов и приводит к стимуляции роста грануляционной ткани, улучшению микроциркуляции крови в раневом дефекте. Полученные данные могут стать основой для дальнейших исследований по использованию ММСК не только в терапии хронических ран, но и других заболеваний, характеризующихся развитием хронического воспаления.

Полученные данные о поверхностных рецепторах, участвующих в регуляции иммуномодулирующей активности ММСК могут быть использованы в дальнейших научных и клинических изысканиях, предоставляя возможность разработать новые подходы к предварительной оценке регенеративного потенциала ММСК, путем измерения уровня экспрессии молекулы HLA-DR на поверхности мембран.

### **Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации**

Определение IFN- $\gamma$  как критического фактора, участвующего в инициации и регуляции иммуномодуляторной активности ММСК, следует использовать для разработки метода повышения терапевтической эффективности ММСК перед трансплантацией путем прекондиционирования их IFN- $\gamma$ .

Полученные данные об индукции синтеза в ММСК поверхностной молекулы HLA-DR в условиях провоспалительного микроокружения следует использовать для разработки метода предварительной оценки регенеративного потенциала ММСК перед трансплантацией.



**Личный вклад автора** заключается в выполнении основного объема теоретических и экспериментальных исследований, изложенных в диссертационной работе, включая разработку клеточных моделей, методик экспериментальных исследований, организации и проведении экспериментов, анализе, обобщении и сравнении результатов с данными современной литературы и оформление их в виде публикаций и научных докладов.

### **Оценка содержания диссертации, ее завершенности**

Обращаясь к структурно-содержательному аспекту работы, хотелось бы отметить, что диссертация грамотно структурирована и изложена в четырех главах по классической схеме, состоящей из введения, обзора литературы, разделов материалы и методы, результаты исследования, их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Содержание диссертационной работы соответствует в полной мере теме и согласуется с поставленными целями и задачами. В работе содержится достаточное количество исходных данных, представленных графиками, таблицами, рисунками и схемами. Работа производит благоприятное впечатление, благодаря логичности изложения материала и обоснованности выводов, подтвержденных обширным и достоверным фактическим материалом. Новизна и обоснованность научных положений не вызывает сомнения. В целом диссертация представляет собой завершенный научный труд и вносит несомненный вклад в преодоление фундаментальных пробелов в знаниях, касающихся молекулярных механизмов регуляции функциональной активности ММСК при воспалении в норме и патологии.

Основные положения диссертации опубликованы в 68 печатных работах, в том числе 20 статей в изданиях, рекомендованных ВАК РФ, и соответствуют теме диссертации. Основные результаты исследования были представлены на профильных научно-практических конференциях и конгрессах. Автореферат

диссертации по своему содержанию соответствует материалам, изложенным в тексте диссертации.

### Замечания

Отмечая научную и практическую значимость работы, высокую степень обоснованности основных ее результатов, хотелось бы указать на некоторые недостатки и дискуссионные положения, имеющиеся в диссертации:

1. На стр.136 написано, что «...Уровень экспрессии коллагена I типа в ММСК костного мозга и жировой ткани сильно варьировал в зависимости от состояния здоровья и возраста доноров ( $67,2 \pm 28,6$  и  $72,8 \pm 31,4$  соответственно) (рисунок 3.5)». Однако в диссертации приводятся средние показатели не интенсивности флюоресценции, а пропорциональное количество клеток, экспрессирующих коллаген I типа. Некоторое представление о различиях уровня экспрессии коллагена I типа можно увидеть на репрезентативных микрофотографиях рисунка 3.5. Однако по ним трудно составить представление об особенностях экспрессии коллагена I типа у доноров с различным возрастом и состоянием здоровья.

2. На рисунке 3.40, (А) относительный уровень экспрессии мРНК COX2 в ММСК при сокультивировании ММСК и актМПК в соотношении 1:50 в 4 раза выше, чем при соотношении этих культур клеток 1:25. Однако, на рисунке Б, концентрации ампликонов, характеризующие уровень экспрессии мРНК COX2 при этих же соотношениях клеток, практически одинаковы. Считаю, что в этом случае следовало бы представить более адекватные репрезентативные данные или объяснить данное несоответствие.

3. В работе детально описаны эффекторные сигнальные пути, регулирующие иммуномодуляторную активность ММСК в условиях провоспалительного микроокружения. Однако данные получены в моделях *in vitro*. В качестве вопроса хотелось бы узнать мнение автора: «Существуют ли



подтверждения тому, что эти же сигнальные каскады активируются в эндогенных ММСК при воспалении в организме человека?»

Указанные замечания не влияют на общую положительную оценку представленного диссертационного исследования и носят рекомендательный характер для дальнейшей работы по этому направлению.

### **Заключение**

Все вышеизложенное позволяет утверждать, что диссертация 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, является законченной самостоятельной научно-квалификационной работой, в которой в моделях *in vitro* и в клинических исследованиях с участием человека показана способность ММСК вызывать функциональные изменения иммунных клеток и координировать баланс между провоспалительными и противовоспалительными факторами в очаге воспаления, создавая условия, необходимые для успешного заживления поврежденных тканей. В данной работе на основании выполненных автором исследований разработаны теоретические положения, совокупность которых можно квалифицировать как научное достижение при решении проблем лечения пациентов с хроническими ранами и язвами.

Представленная работа полностью 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 03.01.04 – биохимия), профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории прототипирования и испытаний биотехнологических разработок Биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова  
119234, Москва, ул. Ленинские Горы, д.1, стр. 12  
Тел.: 8 (495) 939-17-46 (адм.); 8(985)295-70-05 (моб.)  
e-mail: aiglukhov1958@gmail.com

Александр Иванович  
Глухов

Подпись руки Глухова А.И. заверяю  
Декан Биологического факультета  
Московского государственного  
Университета имени М.В.Ломоносова,  
академик РАН

Кирпичников М.П.

17 июля 2017

