

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. Паракринные и иммуномодулирующие свойства мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) обуславливают возрастающий интерес к их терапевтическому использованию в случаях нарушения нормального процесса регенерации тканей, одним из следствий которого является возникновение хронических воспалительных процессов. Противовоспалительная, хемоаттрактивная, антиапоптотическая и антифиброзная активность, осуществляемая ММСК в воспаленных тканях, способствует процессу заживления. Однако, многие аспекты проводимых в этой области фундаментальных и прикладных исследований остаются неопределенными, включая идентификацию и функционирование ММСК *in vitro* и *in vivo*. Фундаментальные пробелы в знаниях о внутриклеточных и межклеточных механизмах, ответственных за координацию сигнальных каскадов при взаимодействии ММСК с другим клетками в очаге воспаления являются препятствиями к успешной разработке лекарственных препаратов нового поколения. Определение факторов, участвующих в регуляции внутриклеточных сигнальных каскадов, влияющих на функциональную активность ММСК, и управляющих течением воспалительного процесса, способных радикально изменить специфические генетически контролируемые ответы клеток на поступающие сигналы и осуществить селективные фенотипические эффекты в механизмах передачи сигналов в организме для стимуляции регенеративных процессов в тканях является весьма актуальным направлением исследований как с теоретической, так и практической точек зрения.

Новизна исследования и полученных результатов, выводов, рекомендаций. В данном исследовании описаны временные и пространственные изменения в регуляции генов и паракринной среде, сопровождающие эффект иммуносупрессии, опосредованный ММСК, в

смешанных культурах с активированными иммунокомпетентными клетками, создающими провоспалительное микроокружение. В результате комплексного подхода к исследованию фенотипического и функционального статуса клеток, автором впервые получены подтверждения тому, что культивируемые ММСК конститутивно секретируют высокие уровни IL-6, IL-8, MCP-1 и PGE-2, проявляя исходный провоспалительный фенотип. Показано, что в ответ на воспалительные сигналы, исходящие от микроокружения, продуцируемого активированными иммунными клетками, в ММСК происходит активация противовоспалительной функциональной активности за счет индукции экспрессии фермента IDO, сопровождающейся формированием уникальной цитокиновой сигнатуры. Впервые идентифицированы цитокины, продукция которых коррелирует с подавлением пролиферации активированных иммунных клеток. Снижение секреции цитокинов IL-10, IL-13, IL-5 и MIP-1b отражает многофункциональную супрессивную реакцию иммунных клеток на воздействие ММСК. Активация IL-1, IL-6, IL-8, IFN- γ , MCP-1 и G-CSF указывает на множественный ответ, который приводит к активации регуляторных путей в различных лимфоидных и миелоидных клетках. Впервые установлена зависимость продукции IDO, IL-1, IL-6, G-CSF и MIP-1b от наличия или отсутствия прямых контактов между ММСК и активированными иммунными клетками, указывающая на важность межклеточных коммуникаций в их регуляции.

Противовоспалительное действие ММСК, способствующее смещению хронического воспалительного процесса в сторону заживления впервые подтверждено результатами рандомизированного плацебо-контролируемого исследования с участием пациентов с длительно незаживающими ранами различной этиологии. Установлено, что введение суспензии ММСК по периферии раны и в дно раневого дефекта способствует росту грануляционной ткани, улучшению показателей микроциркуляции крови, ускорению эпителизации.

В работе также предложен оригинальный подход к изучению молекулярных механизмов регенерации тканей на разных стадиях развития организма. Разработаны и охарактеризованы модели клеток параксиальной мезодермы эмбриона человека, ММСК неонатальных тканей, и ММСК взрослого человека. Впервые установлены морфофункциональные отличия

клеток параксиальной мезодермы по экспрессии генов BRY, SNAI1, TBX6, MIXL1 и ММСК пуповины по экспрессии нестина и CD117 от ММСК взрослого человека.

Обоснованность и достоверность положений и выводов диссертации подтверждается компетентной постановкой исследовательской проблемы, целью, совокупностью решаемых задач по ее достижению, достаточном объеме материала, современном и адекватном методическом уровне, корректных способах статистической обработки данных. Автором представлены убедительные данные, подтверждающие способность ММСК изменять экспрессионный и секреторный статус под действием сигналов, поступающих от микроокружения, и участвовать в регуляции воспалительных процессов в моделях *in vitro* и клинических исследованиях *in vivo*. Анализ изученных источников отечественных и зарубежных научных трудов в области биологии ММСК и регенеративной медицины явился обширной теоретической и методологической базой диссертационного исследования. Работа выполнена с использованием большого количества образцов культивируемых *ex vivo* ММСК, которые были выделены из костного мозга, жировой ткани, кожи взрослого человека, из неонатальных тканей (пуповины новорожденного), а также клеток параксиальной мезодермы (предшественников ММСК), полученных путем дифференцировки из ИПСК. Адгезивные культуры ММСК и их предшественников охарактеризованы на соответствие критериям Международного общества клеточной и генной терапии для ММСК (ISCT), по экспрессии поверхностных маркеров CD73, CD90, CD105, по способности к дифференцировке в остеогенном, адипогенном и хондрогенном направлении. Установлены специфические отличия клеток параксиальной мезодермы эмбриона человека и ММСК неонатальных тканей от ММСК взрослого человека по экспрессии генов BRY, SNAI1, TBX6, MIXL1, а также белков нестина и CD117.

Положения и выводы, основанные на результатах, показавших, что в условиях провоспалительного микроокружения ММСК приобретают способность подавлять пролиферацию и активацию иммунокомпетентных клеток за счет индукции синтеза IDO через активацию сигнального пути IFN- γ и рецепторное взаимодействие молекул HLA-DR и костимуляторных молекул CD80/CD86 с их контррецепторами на Т-лимфоцитах, которые образуют

регуляторную петлю с положительной обратной связью, способствующую затуханию воспалительной реакции, позволили обосновать возможность использования ММСК в медицинской практике для коррекции течения хронических воспалительных процессов.

В плацебо-контролируемых клинических исследованиях приняли участие 108 пациентов с длительно незаживающими ранами различной этиологии, которые были рандомизированы в группу клеточной терапии и группу сравнения, сопоставимые по полу, возрасту и структуре заболеваний, приводящих к развитию хронических ран. Результаты исследования, демонстрирующие эффективность подкожных инъекций суспензии ММСК пуповины в сравнении с плацебо у таких пациентов, позволили рекомендовать использование такого подхода в терапии других заболеваний, характеризующихся развитием хронических воспалительных процессов.

Проведен критический всесторонний сравнительный анализ собственных результатов со значительным числом современных отечественных и зарубежных публикаций. В целом, большой объем проведенной экспериментальной работы позволил автору в должной степени обосновать все научные положения, выносимые на защиту. Выводы, сформулированные в диссертации, соответствуют положениям, выносимым на защиту, и отражают ключевые результаты, полученные в диссертации. Таким образом, достоверность и обоснованность полученных автором результатов и представленных выводов не вызывает сомнения.

Научная и практическая значимость работы заключается в том, что полученные результаты приумножают и систематизируют сведения о молекулярных механизмах, участвующих в индукции противовоспалительной активности ММСК, а также выявляют новые молекулярные мишени для повышения терапевтической эффективности ММСК. Автором продемонстрирована возможность использования антагонистов молекулы адгезии ICAM-1, а также IFN- γ , IL-1, IL-6 и G-CSF и их комбинаций в качестве индукторов функциональной активности культивируемых ММСК для усиления иммуномодуляторных свойств перед трансплантацией или для мобилизации эндогенных ММСК. Итогом успешной трансляции экспериментальных данных в реальную практику явились положительные результаты клинических исследований безопасности и эффективности ММСК у пациентов с

хроническими ранами различной этиологии, которые продемонстрировали, что введение в область раневого дефекта препарата ММСК пуповины в форме суспензии стимулирует рост грануляционной ткани, улучшает параметры микроциркуляции крови, ускоряет эпителизацию. Полученные данные открывают новые направления и широкие перспективы для дальнейшего исследований терапевтического потенциала ММСК. Разработанные в данной работе клеточные модели примитивной мезодермы и ММСК в результате последовательной дифференцировки ИПСК в мезодермальном направлении открывают возможности для дальнейшего исследования молекулярных механизмов регенерации тканей, присущих разным стадиям развития организма человека, позволяющих преодолеть проблемы, связанные с возрастным снижением регенеративного потенциала тканей, а также обосновывают принципиально новые подходы по терапевтическому использованию клеток и выделяемых ими факторов.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации. Новые фундаментальные данные о критических факторах, задействованных в индукции противовоспалительной активности ММСК, рекомендуется использовать в курсах лекций биологических вузов, посвященных клеточной сигнализации. Результаты клинических исследований эффективности ММСК у пациентов с хроническими ранами различной этиологии могут быть использованы соответствующими учреждениями медицинского профиля.

Оценка содержания диссертации, ее завершенности

Диссертация написана по традиционной схеме, состоит из введения, 4 глав, заключения, выводов, списка сокращений, списка цитируемой литературы и приложения. Работа изложена на 334 страницах, иллюстрирована 70 рисунками, содержит 9 таблиц, включает 582 источника литературы.

Во «Введении» изложена суть проблемы и обоснованы ее актуальность, цель и задачи исследования, сформулированы положения, выносимые на защиту, описаны научная новизна, научно-практическая значимость, собственный вклад в работу, приведены данные об апробации результатов исследования.

В «Обзоре литературы» рассмотрены возможные патофизиологические исходах при различных нарушениях нормального процесса восстановления

поврежденных тканей. Изложены современные представления о вовлеченности клеточных и паракринных компонентов в динамике заживления поверхностных ран. Проанализирована и обобщена информация о фенотипических характеристиках, а также паракринных и иммуномодулирующих свойствах ММСК, культивируемых *in vitro*. Приведены имеющиеся к сегодняшнему дню данные о терапевтической эффективности ММСК при заболеваниях, для которых на современном этапе не существует эффективных и специфически лекарственных средств. Дан анализ возможных путей преодоления возрастного снижения регенеративного потенциала тканей. Обзор написан хорошим литературным языком, свидетельствует о прекрасном знании автором современного состояния в данной области и является солидным теоретическим фундаментом, используемым в дальнейшем для обсуждения результатов. Эта часть работы позволила автору не только охарактеризовать всю проблему в целом, но и логически обосновать цель и задачи исследования.

В главе «Материалы и методы исследования» весьма квалифицированно и достаточно подробно описаны основные методические подходы, приводятся сведения о протоколах экспериментов. Адекватность методических приемов не вызывает сомнений. В отдельном подразделе рассмотрены данные о статистической обработке и использованных критериях значимости.

В первом разделе главы «Результаты» приводятся данные о сходстве и различиях фенотипических характеристик и дифференцировочного потенциала ММСК человека, выделенных из различных тканей. Эти результаты позволили спрогнозировать более высокий регенеративный потенциал ММСК пуповины новорожденного по сравнению с ММСК взрослого человека, связанный с пропорционально более высоким содержанием прогениторных клеток, экспрессирующих нестин и CD117, и рассмотреть их потенциальное применение в медицинской практике. В разделе 2 изучены временные и пространственные изменения в регуляции генов, паракринной среде и функциональной активности ММСК в смешанных культурах с активированными иммунокомпетентными клетками. Показано, что под действием провоспалительных сигналов, поступающих от микроокружения, ММСК приобретают способность подавлять пролиферацию и активацию иммунных клеток. Иммуносупрессивный эффект сопровождается изменением исходного фенотипа ММСК, проявляющегося в индукции экспрессии IDO.

Выявлены критические факторы, участвующие в регуляции синтеза этого фермента в ММСК. IFN- γ и рецепторное взаимодействие молекул HLA-DR и костимуляторных молекул CD80/CD86 на ММСК с их контррецепторами на Т-лимфоцитах, индуцируя синтез IDO в ММСК, образуют регуляторную петлю с положительной обратной связью, способствующую подавлению активации иммунных клеток и затуханию воспалительной реакции. Третий и четвертый раздел посвящен изучению возможности трансляции экспериментальных данных в медицинскую практику. Подробно рассмотрены процессы разработки стандартов и технологические аспекты изготовления препарата ММСК в форме суспензии для клинического применения. Приведены результаты пилотного клинического исследования безопасности и эффективности препарата ММСК пуповины для лечения пациентов с хроническими ранами различной этиологии. Показано, что локальное введение ММСК пуповины по периферии и в дно хронических раневых дефектов вызывает активный рост грануляционной ткани, улучшает параметры микроциркуляции крови, создавая благоприятное микроокружение для естественной реэпителизации раны или проведения аутодермопластики расщепленным лоскутом. Однако у взрослого человека заживление поврежденной ткани происходит, как правило, с образованием рубцовой ткани. Для исследования аспектов, связанных с возрастным снижением регенеративного потенциала тканей, в пятом разделе автор обратился к феномену заживления фетальных тканей, которые в отличие от взрослых, способны к полной регенерации. В настоящее время физиологические, клеточные и молекулярные механизмы регенерации фетальных тканей остаются практически неизвестными, поскольку подобные эксперименты ограничены практически недоступностью материала для сопоставимых исследований. Автором предложены оригинальные методические подходы к созданию клеточных моделей, соответствующих разным стадиям развития организма. С использованием технологии репрограммирования соматических клеток в плюрипотентное состояние и их последующей дифференцировкой в мезодермальном направлении, позволяющей воспроизвести процессы эмбриогенеза, автором получены и охарактеризованы клетки параксиальной мезодермы эмбриона и ММСК из одного источника ИПСК человека, обеспечивающие возможность проведения сравнительных экспериментов по

изучению особенностей молекулярных механизмов заживления повреждений в разных стадиях развития организма человека.

Обсуждение результатов, приведенное в отдельной главе, выполнено исключительно корректно, все полученные данные подвергнуты всестороннему анализу. Сделанные выводы логически вытекают из результатов и полностью соответствуют положениям, вынесенным на защиту.

Диссертация завершается общим «Заключением», где подводятся итоги выполненных исследований.

В целом диссертация является результатом планомерного кропотливого труда, проделанного на высоком методическом уровне, и представляет собой законченный научный труд. Работу отличает систематичность и тщательный анализ полученных результатов. Обширный и достоверный фактический материал изложен логично, каждый последующий этап работы органично вытекает из предыдущего. Работа превосходно иллюстрирована микрофотографиями высокого качества, наглядными рисунками и схемами, исходные данные представлены в виде графиков и таблиц. Новизна и обоснованность научных положений не вызывает сомнения.

Основные положения диссертации опубликованы в 68 печатных работах, в том числе 20 статей в изданиях, рекомендованных ВАК РФ, и соответствуют теме диссертации. Результаты исследования были представлены на профильных научно-практических конференциях и конгрессах. Опубликованные статьи и тезисы говорят **об авторском вкладе** в проведенные исследования, полностью отражают содержание диссертации.

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

Замечания.

Работа не вызывает значительных замечаний по форме, способу изложения или содержанию. Тем не менее, по итогам ознакомления с диссертацией, возник ряд вопросов и дискуссионных моментов.

1. В первом разделе, посвященном сравнению МСК различного происхождения, была бы очень уместна таблица с общей характеристикой и числом доноров/пациентов, от которых были взяты стволовые клетки.

2. Эксперименты по контактному культивированию мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток и мононуклеарных клеток периферической крови указывают на значение физического контакта между этими типами клеток. Известно, что основным сигнальным путем, ответственным за межклеточную сигнализацию, является сигнальный путь Notch. Было бы интересно оценить активацию этого сигнального пути в исследуемой клеточной систем.
3. Несомненную ценность работы представляют данные, полученные в клинических исследованиях. Представление данных по пациентам в виде точечных диаграмм, а не в виде гистограмм, представляется более объективным и в целом дало бы больше информации о группах пациентов.
4. С чем связано то, что в экспериментах по изучению иммуномодуляторных свойств ММСК были использованы клетки жировой ткани, а не клетки пуповины?
5. Как автор видит применение находок по взаимодействию МПК и ММСК в клинике?

Следует отметить, что заданные вопросы ни в коей мере не снижают общего положительного впечатления о работе.

Заключение

Диссертационная работа Суздальцевой Юлии Геннадиевны на тему «Функциональная активность мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток человека различного генеза в условиях провоспалительного микроокружения», представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.22. – клеточная биология, является законченной научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований разработаны теоретические положения, совокупность которых можно квалифицировать как научное достижение, заключающееся в предложении концептуального подхода к пониманию молекулярных механизмов функциональной активности ММСК и практическом обосновании использования ММСК для коррекции течения хронических воспалительных процессов у человека. Полученные результаты

имеют фундаментальное и практическое значение для гистологии, цитологии, клеточной биологии, патофизиологии и иммунологии.

По актуальности темы, методическому подходу к решению поставленных задач, новизне и научно-практической значимости полученных результатов, качеству публикаций 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, Суздальцева Ю.Г., 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),
Заведующая лабораторией регенеративной биомедицины
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Институт цитологии Российской академии наук
194064, Санкт-Петербург,
Тихорецкий проспект 4
Тел.: +7(812)297-18-29
Email: amalashicheva@gmail.com

Анна Борисовна
Малашичева

Подпись Малашичевой А.Б. заверяю:

Ученый секретарь Института цитологии РАН,
к.б.н.



И.И. Тюреева