

УТВЕРЖДАЮ

Директор

Федерального государственного бюджетного  
учреждения науки Государственного научного  
центра Российской Федерации Институт  
медико-биологических проблем Российской  
академии наук, д.м.н., академик РАН



  
Орлов О.И.

« 18 » 11 2022 г.

### ОТЗЫВ ВЕДУЩЕГО УЧРЕЖДЕНИЯ

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

**Актуальность работы** Суздальцевой Юлии Геннадиевны не вызывает сомнений. Исследования последних десятилетий продемонстрировали, что полноценная регенерация поврежденной ткани невозможна без участия клеток стромального дифферона. В связи с этим мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК) рассматриваются в настоящее время как перспективное терапевтическое средство, благодаря тому, что они могут быть прижизненно выделены из разных тканей и размножены *in vitro*. ММСК способны регулировать регенерацию тканей за счет паракринного и иммуномодулирующего действия. Цитокины, хемокины, факторы роста и внеклеточные везикулы, секретируемые ММСК, участвуют в регуляции внутриклеточных сигнальных каскадов, стимулирующих ангиогенез, рекрутирование клеток в очаги воспаления и ремоделирование внеклеточного матрикса. Они оказывают противовоспалительное, иммуномодулирующее, хемоаттрактивное, антиапоптотическое, антиоксидантное и антифиброзное действие в воспаленных тканях, способствуя процессу заживления. Внешние сигналы, поступающие от микроокружения, изменяют экспрессионный и секреторный профиль ММСК, позволяя им выполнять регуляторную функцию в

очаге воспаления. Следовательно, локальная среда имеет решающее значение для индукции функциональной активности ММСК. Однако временные и пространственные изменения паракринной среды, возникающие под влиянием ММСК при воспалении, изучены недостаточно. Особое значение в этой связи приобретает проблема функционирования ММСК в условиях нарушения нормальных процессов регенерации тканей, например, при хронических воспалительных процессах, одним из следствий которого является возникновение длительно незаживающих ран (хронических ран, трофических язв), существующих продолжительное время без признаков активного заживления. Лечение хронических ран представляет крайне сложную клиническую проблему в связи с отсутствием эффективных и специфических лекарственных средств. Число людей, страдающих такими заболеваниями, остается неизменным многие годы, несмотря на предлагаемые новые методы терапии. В связи с этим, изучение влияния факторов микроокружения на противовоспалительную активность ММСК является актуальным для понимания фундаментальных механизмов регенерации тканей, а также для решения современных задач регенеративной медицины.

**Научная новизна** проведенного исследования заключается в том, что в результате комплексного исследования механизмов реципрокного взаимодействия ММСК и иммунокомпетентных клеток в условиях моделирования провоспалительного микроокружения, впервые установлены ключевые молекулы, участвующие в активации функционального состояния ММСК, способствующего затуханию воспалительной реакции. Показано, что рецепторное взаимодействие молекулы HLA-DR и костимуляторных молекул CD80/CD86 на ММСК с их контррецепторами на Т-лимфоцитах вызывает индукцию синтеза фермента IDO в ММСК, который, катаболизируя триптофан, способствует подавлению активации и пролиферации иммунных клеток. Связывание молекул адгезии ICAM-1 на ММСК с интегрином LFA-1 на поверхности Т-лимфоцитов приводит к усилению секреции клетками IFN- $\gamma$ , который также участвует в индукции синтеза IDO в ММСК. Воздействие IFN- $\gamma$  и рецепторное взаимодействие ММСК и CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, вызывая усиление синтеза IDO, образуют регуляторную петлю с положительной

обратной связью. Функциональная активность ММСК в условиях провоспалительного микроокружения по отношению к иммунокомпетентным клеткам проявляется также в координации баланса между провоспалительными и противовоспалительными факторами, секретируемых ими. Впервые установлено, что подавление активации и пролиферации активированных иммунных клеток сопровождается увеличением концентраций IL-1, IL-6, IFN- $\gamma$ , G-CSF и снижением концентраций IL-10, IL-13.

Выраженная иммуномодулирующая активность обуславливает возможность использования ММСК в терапии заболеваний, характеризующихся развитием хронических воспалительных процессов. Впервые показана безопасность и эффективность препарата ММСК для лечения пациентов с хроническими ранами и язвами различной этиологии. Установлено, что локальное введение суспензии ММСК по периферии раневого дефекта (подкожно и внутримышечно), в дно раны (интрагрануляционно или внутримышечно) вызывает смещение хронического воспалительного процесса в сторону заживления за счет стимуляции роста грануляционной ткани и улучшения микроциркуляции крови.

Выявленные автором закономерности функционирования ММСК в условиях провоспалительного микроокружения имеют большое значение для развития **научного направления и медицинской практики**. В последние годы разрабатываются новые многообещающие подходы, направленные на повышение терапевтической эффективности ММСК, такие как праймирование цитокинами, факторами роста, фармацевтическими препаратами, биоматериалами, также прекондиционирование в различных условиях культивирования, включая гипоксию. В диссертационном исследовании фундаментально обоснована возможность использования IL-1, IL-6, IFN- $\gamma$ , G-CSF для прекондиционирования ММСК для усиления иммуномодуляторных свойств перед трансплантацией. Предложен новый способ проверки функционального статуса культивируемых ММСК, обеспечивающих предварительную оценку регенеративного потенциала путем измерения уровня экспрессии HLA-DR на поверхности мембран или измерения уровня экспрессии фермента IDO в ММСК.

В результате проведенного рандомизированного плацебо-контролируемого клинического исследования практически подтверждена гипотеза о том, что ММСК способны выполнять регуляторную функцию в очаге повреждения. Показано, что локальное введение в область раневого дефекта ММСК пуповины способствует улучшению микроциркуляции крови, стимулирует рост грануляционной ткани и формирует благоприятные условия для естественного заживления или проведения аутодермопластики расщепленным лоскутом. Это, несомненно, является весомым доказательством возможности использования ММСК не только в терапии хронических ран, но и при других нозологиях.

В результате работы также сформирован существенный задел для дальнейшего исследования молекулярных механизмов регенерации тканей, позволяющих преодолеть проблемы, связанные с возрастным снижением регенеративного потенциала тканей. Линии клеток параксиальной мезодермы и ММСК, полученных из одного источника в результате последовательной дифференцировки ИПСК, отличающиеся по экспрессии маркеров BRY Snail, TBX6, MIXL1, CD73 и CD105, могут быть использованы для изучения особенностей молекулярных механизмов заживления повреждений в разных стадиях развития организма.

**Обоснованность** положений и выводов диссертации подтверждается проведенным анализом существующих научных подходов к решению фундаментальных проблем регенеративной медицины, компетентной постановкой исследовательской проблемы, целью и совокупностью решаемых задач по ее достижению. **Достоверность** изложенных в диссертации положений и выводов не вызывает сомнений и обеспечивается системным подходом к изучению закономерностей регуляции воспалительного процесса у человека с участием ММСК в норме и при патологии с использованием современных высокотехнологичных методов исследования, адекватных и корректных методов статистического анализа, а также критическим сравнительным анализом собственных результатов с другими данными, опубликованными в современных высокорейтинговых отечественных и зарубежных изданиях.

## Оценка содержания работы

Диссертация построена по стандартной схеме и состоит из введения, 4 глав, заключения, выводов, перечня терминов, списка литературы и приложения. Во введении представлена актуальность исследования, четко обозначена цель исследования и поставлены конкретные задачи. Также во введении обоснована научная новизна исследования, приведены положения, выносимые на защиту, и вклад исследования в конкретное направление науки.

Обзор литературы знакомит с современным состоянием исследований в изучаемой области. Детально рассмотрена роль клеточных и паракринных компонентов в динамике заживления поверхностных ран, а также возможные патофизиологические исходы при различных нарушениях нормального процесса восстановления поврежденных тканей. Подробно освещены современные накопленные данные о морфофункциональных характеристиках ММСК, культивируемых *in vitro*, а также их паракринных и иммуномодулирующих свойствах. Приведены имеющиеся к сегодняшнему дню данные об использовании ММСК в регенеративной медицине при терапии заболеваний, не поддающихся лечению стандартными методами. Рассмотрены потенциальные пути в преодолении возрастного снижения регенеративного потенциала тканей.

В материалах и методах исследования автором подробно описаны способы культивирования и оценки морфофункционального состояния ММСК и их предшественников с использованием методов иммуногистохимии, проточной цитометрии, мультиплексного анализа, ПЦР и иммуноблоттинга. Приведено описание дизайна клинического исследования безопасности и эффективности ММСК у пациентов с хроническими ранами различной этиологии. Использованные методы адекватны поставленным задачам, являются современными и высокотехнологичными, описаны доступно и понятно.

Глава результаты состоит из пяти разделов. Первый раздел посвящен сравнительному анализу фенотипов и дифференцировочного потенциала ММСК, изолированных из различных тканей человека. Полученные результаты позволили описать сходные параметры, присущие ММСК постнатального периода развития

человека, независимо от тканевого происхождения. Установлено также преимущество ММСК пуповины новорожденного по сравнению с ММСК взрослого человека, связанное с пропорционально более высоким содержанием прогениторных клеток, экспрессирующих нестин и рецептор фактора роста стволовых клеток (CD117), определяющих регенеративный потенциал. Второй раздел содержит описание молекулярных механизмов реципрокного взаимодействия ММСК и иммунокомпетентных клеток в моделях *in vitro*, опосредованных растворимыми факторами и межклеточными контактами. Оказалось, что культивируемые ММСК исходно обладают провоспалительным фенотипом, выражающимся в конститутивной экспрессии фермента СОХ-2, высоким уровнем секреции IL-6, IL-8, и MCP-1. Воздействие провоспалительного микроокружения, создаваемого активированными иммунокомпетентными клетками, приводит к активации противовоспалительного сигнального каскада в ММСК, проявляющегося в индукции синтеза и функциональной активности фермента IDO, которая опосредуется IFN- $\gamma$  и адгезионными межклеточными контактами, образуемыми за счет связывания молекулы межклеточной адгезии 1 типа на ММСК с Т-лимфоцитарным интегрином LFA-1 и рецепторного взаимодействия костимуляторных молекул CD80/CD86 на ММСК с их Т-лимфоцитарными контррецепторами. Установлено также, что ММСК способны влиять на функциональное состояние иммунных клеток и осуществлять динамическое модулирование цитокинового микроокружения при взаимодействии с ними. Установление механизмов индукции иммуномодуляторной и противовоспалительной активности ММСК позволило обосновать возможность их применения в практической медицине для коррекции воспалительных процессов. В третьем разделе подробно рассмотрены процессы разработки стандартов и технологические аспекты изготовления препарата ММСК в форме суспензии для клинического применения. В четвертом разделе главы приведены результаты клинического исследования безопасности и эффективности препарата ММСК пуповины в форме суспензии для лечения пациентов с длительно незаживающими ранами различного этиологии, подтверждающие гипотезу о том, что ММСК

обладают способностью выполнять регуляторную функцию в очаге повреждения и смещать хронический воспалительный процесс в сторону заживления. В этом разделе автор показывает, что введение ММСК пуповины пациентам с длительно незаживающими ранами дополнительно к стандартному лечению приводит к активизации регенеративных процессов в раневом дефекте, вызывает активный рост грануляционной ткани, создавая благоприятное микроокружение для естественной реэпителизации раны или проведения аутодермопластики расщепленным лоскутом. В связи с тем, что в большинстве случаев заживление хронических ран приводило к контракции и завершалось формированием рубцовой ткани (фиброзом), в пятом разделе автор предложил оригинальный подход к исследованию аспектов, связанных с возрастным снижением регенеративного потенциала тканей. Отталкиваясь от феномена регенерации фетальных тканей, заживление которых в отличие от взрослых происходит в условиях сниженной воспалительной реакции без образования фиброзной ткани, автор провел исследование возможных путей создания *in vitro* моделей мезодермальных клеток, соответствующих разным стадиям развития организма. С использованием технологии репрограммирования соматических клеток в плюрипотентные состояние и их последующей дифференцировкой в мезодермальном направлении, позволяющей воспроизвести процессы эмбриогенеза, получены и охарактеризованы клетки параксиальной мезодермы эмбриона и ММСК из одного источника ИПСК человека. Полученные клеточные модели обеспечивает возможность установления критических факторов, определяющих функциональную активность клеток ранней мезодермы по сравнению с ММСК постнатального периода развития организма человека в условиях моделирования провоспалительного микроокружения.

В главе «Обсуждение» приведен критический сравнительный анализ собственных результатов с данными других исследователей, опубликованных в современных высокорейтинговых отечественных и зарубежных изданиях.

В главе «Заключение» диссертант Суздальцева Ю.Г. кратко резюмирует полученные экспериментальные данные. Выводы, представленные в

соответствующей главе диссертационного исследования, полностью вытекают из полученных экспериментальных данных и сделанных заключений.

Диссертация представляет собой законченный труд и вносит несомненный вклад в решение фундаментальных проблем регенеративной медицины. Содержание диссертации в полной мере соответствует теме, материал изложен последовательно, логично и аргументировано. Исследование выполнено на высоком научном и современном методическом уровнях, выводы его обоснованы и достоверны.

Основные положения работы достаточно полно изложены в 68 печатных работах, 20 научных статей из которых опубликованы в изданиях, рекомендуемых ВАК РФ, доложены на профильных зарубежных и отечественных конференциях и конгрессах. Опубликованные статьи и тезисы говорят об авторском вкладе в проведенные исследования.

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

#### **Рекомендации по использованию результатов диссертации**

Результаты клинических исследований эффективности и безопасности препарата ММСК могут быть использованы соответствующими учреждениями медицинского профиля, а полученные новые фундаментальные данные о молекулярных механизмах индукции функциональной активности ММСК в условиях воспаления - в курсах лекций биологических и медицинских вузов.

#### **Принципиальных замечаний по представленной работе нет.**

При изучении работы возникли замечания, а также вопросы, которые можно обсудить в порядке дискуссии при защите работы:

#### **Замечания**

1. На Рис.1.4. среди мезодермальных потомков стволовых клеток отсутствуют потомки объекта исследования данной работы - МСК, – клетки костной, жировой и хрящевой ткани, а также гладкомышечные клетки.

2. В материалах и методах в разделе о проточной цитометрии было бы удобнее для читателя, если бы информация об использованных антителах была представлена в виде таблицы. Это также относится к данным проточной цитометрии



по относительно экспрессии различных антигенов, которые представлены в разделе Результаты.

3. В работе охарактеризованы ММСК из кожи человека. Какая ткань этого органа использована для получения клеток. В материалах и методах не описано получение и культивирование этих клеток.

4. В работе имеются единичные опечатки и стилистические неточности.

### **Вопросы**

1. Что известно об иммуностимулирующей активности ММСК и ее роли в хронизации воспаления.

2. Каков личный вклад автора в проведение контроля зараженности биоматериала, а также организацию и проведение клинического исследования.

3. Как были охарактеризованы исходные МПК? Как учитывали индивидуальные различия между донорами МПК при оценке иммуносупрессивных эффектов ММК.

4. Почему для анализа иммуносупрессивных эффектов были выбраны ММСК из жировой ткани, а для клинического исследования – МММСК из пуповины?

5. Какие ММСК-опосредованные механизмы могли способствовать заживлению ран в Вашем исследовании? Каков вклад иммуномодуляторного компонента? Какой срок удержания ММСК в ране после введения?

### **Заключение**

Диссертация 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 самостоятельно выполненной законченной научно-квалификационной работой, в которой в моделях *in vitro* и клинических исследованиях проведено изучение общих закономерностей регуляции ММСК иммунного и воспалительного ответа у человека и предложены перспективные подходы к повышению терапевтического потенциала ММСК, совокупность которых можно квалифицировать как научное достижение в решении проблем лечения заболеваний, характеризующихся нарушениями процессов заживления ран.

