# ОТЗЫВ

**официального оппонента на диссертацию Горюнова Кирилла Владимировича «Молекулярные механизмы действия мезенхимных стромальных клеток на Т-лимфоциты человека», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология**

**Актуальность темы выполненной работы**

В работе Горюнова К.В. исследуется проблема расшифровки молекулярных механизмов взаимовлияния между мультипотентными мезенхимными стромальными клетками (МСК) и лимфоцитами (CD4 Т-хелперами), экспериментально подтверждаются новые взгляды на МСК как на клетки с иммуномодулирующими, а не только иммуносупрессорными свойствами, показана и обоснована важность молекул клеточной адгезии для контактной молекулярной регуляторной программы МСК человека. Литературные данные свидетельствуют, что хроническое воспаление является важной составляющей многих аутоиммунных заболеваний, в ходе которых аутореактивные Т-клетки (в основном Th1, Th2, Th17) распознают антиген собственного организма и запускают иммунный ответ за счет секреции воспалительных цитокинов, таких как IL-17, 13, 9 (интерлейкины) IFN-γ (интерферон-γ), TNF-α (фактор некроза опухоли α). Эффективного лечения аутоиммунных патологий на данный момент не найдено. В 2002 у МСК были экспериментально обнаружены иммуносупрессорные свойства, что открыло новое поле деятельности для исследователей – изучение механизмов иммуносупрессии и внедрение МСК в клиническую практику. Однако полученные различными исследователями результаты зачастую противоречат друг к другу, что мешает увидеть общую картину в целом. В связи с этим, использование МСК в рутинной терапии аутоиммунных заболеваний, а также трансплантологии и ряде других отраслей современной медицины в настоящее время затруднено. Основная проблема заключается в недостаточных знаниях молекулярных механизмов взаимодействия между МСК и иммунными клетками, в том числе и лимфоцитами. На данный момент установлен ряд эффекторных молекул: IDO (индоламин-2,3-диоксигеназа), NO (оксид азота II), PGE2 (простагландин E2), и недавно открытых TSG6 (ген белка 6,

стимулированный TNF-α), галектинов, HLA-G (человеческий лейкоцитарный антиген,1 типа, G), участвующих в этих регуляторных молекулярных механизмах, а также установлено, что МСК могут осуществлять свою регуляторную функцию как контактным, так и бесконтактным способом. Но при этом отдельные звенья этих молекулярных механизмов, в которых участвуют выше перечисленные молекулы остаются неизвестными. Это приводит к тому, что на данном этапе так и не удается предсказать поведение клеток in vivo в условиях различных аутоиммунных патологий, что тормозит разработку протоколов терапии с помощью МСК.

В этой связи остаются крайне актуальными in vitro исследования по расшифровке молекулярных механизмов взаимодействия между МСК и лимфоцитами в связи с меньшим количеством факторов в системе и большими возможностями контроля условий в эксперименте. В диссертационном исследовании Горюнова К.В. впервые выявлены особенности экспрессии генов молекул адгезии человеческих МСК: ICAM-1, VCAM-1 и ряда других кадгеринов и селектинов, изучена роль блокировки ICAM-1 на поверхности МСК и лимфоцитов в иммунорегулирующей программе МСК, получены данные, демонстрирующие возможность МСК поддерживать выживание интактных Т-клеток в условиях отсутствия стимуляции in vitro. Результаты, полученные в ходе работы имеют важное фундаментальное значение для более глубокого понимания биологии МСК в целом и их взаимодействия с иммунными клетками, а также практическое применение для создания терапии аутоиммунных заболеваний с помощью МСК.

**Научная новизна работы**

В работе впервые установлена важность молекулы межклеточной адгезии 1 типа ICAM-1 в регуляторном механизме взаимовлияния между МСК и лимфоцитами. Автором показано, что ICAM-1 на поверхности МСК участвует в механизме иммуносупрессии, который действует на Т-клетки через регуляцию их поверхностного уровня CD25 или α-субъединицы рецептора IL-2. В эксперименте также установлено, что величина поверхностного уровня ICAM-1 на МСК за висит от статуса активности Т-клеток.

Автором впервые обнаружено, что блокировка ICAM-1 на поверхности МСК не оказывает никакого влияния на паракринный механизм иммуносупрессии, который реализуется через синтез и ферментативную активность индоламин-2,3-

диоксигеназы – фермента участника кинуренинового пути, ответственного за метаболизм триптофана, необходимого активно делящимся Т-клеткам.

Автором также впервые продемонстрировано, что в отсутствии предварительной экспозиции МСК с воспалительными цитокинами в условиях взаимодействия только с активированными лимфоцитами в МСК инициируется синтез IDO, который начинается с экспрессии гена и заканчивается продукцией полноценной белковой молекулы, обладающей ферментативной активностью.

В работе впервые показано, что ICAM-1 на поверхности МСК участвует не только в иммуносупрессии, но и в поддержке выживания не стимулированных интактных Т-клеток и эта поддержка связана с возрастанием поверхностных уровней ICAM-1 и CD25 на лимфоцитах.

В представленной работе дан ответ на два фундаментальных вопроса, касающихся биологии МСК: подтверждена роль МСК как иммунорегуляторных клеток, а не константных иммуносупрессоров, обоснована важность контактов между МСК и лимфоцитами для усиления наблюдаемых биологических эффектов иммунорегуляции.

**Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации**

Диссертационная работа выполнена с проведением достаточного количества экспериментов для подтверждения наблюдаемых биологических эффектов и обоснования выводов. Использована широко описанная в литературе методика стимуляции Т-клеток с помощью специфических антител. Выбрана адекватная in vitro модель для изучения и регистрации эффектов от взаимовлияния между МСК и лимфоцитами. Применен комплекс современных культуральных методов, клеточный сортинг, ингибиторный анализ, иммуноблоттинг, иммуноферментный анализ, проточная цитофлуориметрия, ПЦР в реальном времени, блокировка антителами и прижизненная флуоресцентная микроскопия Проведен грамотный и соответствующий критериям статистический анализ. Полученные выводы обоснованно и логично вытекают из полученных результатов и являются достоверно подтвержденными.

**Значимость для науки и практической медицины полученных автором результатов**

Результаты диссертационного исследования по изучению взаимного влияния между МСК и Т-лимфоцитами вносят существенный вклад в понимание молекулярно-биологических механизмов иммунорегуляции в целом. Полученные данные о роли МСК как об иммунорегулирующих клетках вносят существенный вклад в создаваемую новую теоретическую модель физиологического воспаления, подтверждают роль МСК на стадии так называемого острого воспаления и позволяют говорить об МСК как о клетках, участвующих в поддержании нормального гомеостаза иммунной системы в тканях в целом.

Результаты, обосновывающие важность молекулы ICAM-1 для иммунорегуляции МСК, подчеркивают необходимость обратить внимание на ICAM-1, как новую терапевтическую мишень для аутоиммунных патологий, таких как ревматоидный артрит, реакция трансплантата против хозяина, где показана роль контактных взаимодействий между клетками для развития заболевания.

Разработанная автором in vitro модель взаимодействия МСК и Т-лимфоцитов in vitro может быть использована как тест-система для анализа иммуносупрессорной способности МСК пациентов, страдающих аутоиммунными патологиями, что в свою очередь поможет ответить на вопрос о перспективах использования для таких пациентов аутологичных или аллогенных МСК для терапии.

Данные о поддержке выживания иммунных клеток со стороны МСК могут также быть применены в клинической практике для восстановления пациентов после лучевой терапии, страдающих иммуннодефицитами.

Результаты исследования применяются в курсе лекций и лабораторной практике на кафедре биохимии и молекулярной медицины факультета фундаментальной медицины Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова. А протоколы выделения МСК и Т-лимфоцитов, описанные автором, внедрены в рутинную практику лаборатории регенеративной медицины ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава РФ

**Личный вклад автора** заключался в анализе литературы по вопросу диссертации, получении МСК из жировой ткани и лимфоцитов из периферической крови, получении очищенной линии CD45CD4CD3 лимфоцитов, моделировании воспалительной реакции с помощью специфических антител, а также широко используемого в практике фитогемагглютинина, анализе результатов, их

выбраковке и адекватной статистической обработке, а также формулировке их в выводы и сравнении с данными современной литературы, подготовке публикаций.

Диссертационное исследование построено логично, работа написана по классической схеме. Обзор литературы, включающий 311 источников (5 отечественных и 308 зарубежных) дает полную картину о современном состоянии исследуемой проблемы диссертации и логично подводит читателя к не раскрытым вопросам, что позволяет обосновать цель и задачи исследования. Полученные автором результаты изложены логично, хорошим литературным языком. Диссертационный материал содержит 5 таблиц, иллюстрирован 36 рисунками, среди которых: графики, микрофотографии высокого качества, и наглядные схемы.

В автореферате и опубликованных работах отражены основные положения диссертации. По материалам работы опубликовано 9 печатных работ, в том числе 3 статьи в журналах из Перечня рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук и ученой степени доктора наук. Результаты доложены на 5 Всероссийских и международных конференциях.

Выводы основаны на большом фактическом материале и логично вытекают из результатов, полученных лично автором.

Есть все основания признать работу завершенной. Принципиальных замечаний, влияющих на положительную оценку работы К.В. Горюнова нет.

При ознакомлении с работой возникли следующие замечания и вопросы:

Замечания.

- При написании работы автор использовал не совсем корректный языковой стиль от 1 лица. В научной литературе принято излагать материал от третьего лица в прошедшей форме. Хотелось бы пожелать автору впредь более внимательно подходить к стилю изложения работы.

-В работе иногда встречаются неточности в формулировках. При описании результатов автор использует термин «скорость пролиферации», что является не совсем корректным и правильнее говорить о времени удвоения и о проценте делящихся клеток. А термин «пролиферация» больше относится к культуре в целом.

-Несмотря на большой объем литобзора, очень сжато описана природа МСК, а также генез основного объекта исследования – МСК жировой ткани.

-При изучении механизмов не был использован метод секвенирования нового поколения, который позволил бы провести сравнительный анализ транскриптома, изучить дифференциальную экспрессию генов МСК и лимфоцитов, провести функциональный анализ, выявить основные транскрипционные факторы, запускающие клеточные сигнальные каскады, являющиеся основой любого молекулярно-биологического механизма. Хотелось бы, чтобы впредь автор использовал эти подходы при изучении любого молекулярно-биологического механизма.

Вопросы.

-В данной работе автор использовал МСК жировой ткани, полученные в ходе операций грыжесечения. Как известно, грыжи часто сопутствуют дисплазии соединительной ткани. Может ли данное обстоятельство как-то влиять на фенотип МСК по сравнению с МСК, полученных из липоаспиратов здоровых людей?

-В работе автор использует две модели in vitro – взаимодействие МСК с тотальной фракцией лейкоцитов периферической крови и с очищенной популяцией CD4 Т-лимфоцитов. Чем было обосновано применение этих 2 систем?

-В работе на рисунке 7А с 74 между контактным и бесконтактным взаимодействием МСК с лимфоцитами отсутствует статистика. Эффект был значимым?

-В работе автор выдвигает гипотезу о возможном участии димеров ICAM-1 на поверхности лимфоцитов и МСК в механизме иммуномодуляции. Есть ли у автора предположения, как эти взаимодействия могут быть организованы?

-Автор описывает способность МСК поддерживать выживаемость интактных CD4 лимфоцитов в отсутствии стимуляции. Хотелось уточнить, измерял ли автор уровень белковых регуляторов апоптоза в лимфоцитах после взаимодействия МСК в данных условиях?

**Заключение**

Диссертация К.В. Горюнова является научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований решена актуальная научная задача – установление механизмов иммунорегулирующего влияния мезенхимных стромальных клеток жировой ткани человека на лимфоциты (CD4 Т-хелперы) в культурах in vitro.

Результаты диссертационного исследования имеют большое теоретическое и практическое значение для клеточной биологии, цитологии, гистологии и патофизиологии.

По актуальности, новизне, теоретической и практической значимости, достоверности полученных результатов диссертация Горюнова К.В. «Молекулярные механизмы действия мезенхимных стромальных клеток на Т-лимфоциты человека», соответствует требованиям пп. 9 - 14 Постановления Правительства РФ «О порядке присуждения ученых степеней» от 24.09.2013 г. №842 в редакции от 28.08.2017 г.№1024, 01.10.2018 №1168 предъявляемым к диссертациям, представленным на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология, а сам автор заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология.

Доктор биологических наук
по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология
заведующий лабораторией генетики стволовых клеток
ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова»
115522, г. Москва, ул. Москворечье, д.1,
8-499-324-20-24, mgnc@med-gen.ru Гольдштейн Д.В.

06.03.2020 г

Данные об оппоненте
Гольдштейн Дмитрий Вадимович, доктор биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология
заведующий лабораторией генетики стволовых клеток
ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова»
115522, г. Москва, ул. Москворечье, д.1,
8-985-233-56-11, dvgoldstein@gmail.ru

Подпись Гольдштейна Д.В. заверяю
Ученый секретарь
ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени
академика Н.П. Бочкова»
кандидат медицинских наук Воронина Е.С.