

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО
ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ



Федеральное государственное бюджетное учреждение
науки Государственный научный центр Российской

Федерации

ИНСТИТУТ

МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОБЛЕМ

Российской академии наук

(ГНЦ РФ-ИМБП РАН)

ИНН/КПП 7714038980/771401001

ОГРН 1027739333710

Хорошевское шоссе, д. 76А, г. Москва, 123007

телефон: (499) 195-15-73,

факс: (499) 195-22-53

e-mail: doc@imbp.ru

http://www.imbp.ru

18.02.2020 № 109/ 51/409

На № _____ от _____



УТВЕРЖДАЮ

Директор ГНЦ РФ ИМБП РАН,

академик РАН Орлов О.И.

« 18 » 02 / 2020 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕГО УЧРЕЖДЕНИЯ

о научно-практической ценности диссертации

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

Актуальность темы выполненной работы

Хроническое воспаление является следствием нарушения регуляции воспалительного процесса, который вместо завершения и последующей стадии репарации способствует дополнительной стимуляции иммунных клеток. В итоге персистирующий воспалительный стимул смещает физиологический воспалительный ответ в сторону бесконтрольной реакции. Подобное состояние часто наблюдается при развитии аутоиммунных заболеваний.

Считается, что в развитии хронического воспаления важную роль играют нарушения в механизмах контроля пролиферации, дифференцировки и активности клеток иммунитета. Несмотря на интенсивное изучение данного вопроса, эффективных методов лечения пока не существует. В связи с этим обнаружение иммунорегулирующих свойств у мезенхимных стромальных клеток (МСК) позволяет говорить о новых дополнительных терапевтических подходах для лечения аутоиммунных патологий. Однако внедрение МСК в рутинную практику откладывается в связи с

появлением данных клинических исследований о неэффективной работе этих клеток для предотвращения развития аутоиммунных патологий.

Основной проблемой являются неполные знания молекулярных механизмов взаимодействия МСК и иммунных клеток, в первую очередь лимфоцитов, ответственных за запуск и поддержание хронической воспалительной реакции. В современной литературе существует большое количество данных, посвященных этому вопросу, однако многие из них противоречат друг другу. Установлены эффекторные молекулы, играющие роль в регуляторных механизмах действия МСК на лимфоциты, среди них индоламин-2,3-диоксигеназа (IDO), оксид азота II (NO), простагландин E2 (PGE2). В последнее время описаны новые молекулы, такие как галектины и ряд других. В итоге, несмотря на общее понимание взаимодействия между МСК и лимфоцитами, появляются новые вопросы в молекулярных механизмах, требующие своего исследования. Помимо этого, в литературе вопрос о контактных механизмах взаимодействия между МСК и лимфоцитами изучен хуже, хотя неоднократно упоминается о большей эффективности контактных механизмов взаимодействия между МСК и лимфоцитами по сравнению с бесконтактными. Однако большинство механизмов установлено на МСК мыши, а ряд механизмов, например, участие молекул адгезии, таких как межклеточная молекула адгезии I типа (ICAM-1) и васкулярная молекула адгезии I типа (VCAM-1) на МСК человека не исследован до сих пор.

Таким образом, необходимы дальнейшие исследования, которые посвящены детальной расшифровке молекулярных механизмов взаимодействия МСК и лимфоцитов. Они позволят ускорить внедрение МСК в клиническую практику для терапии аутоиммунных заболеваний. В связи с этим, актуальность работы Горюнова К.В. не вызывает сомнений.

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

Работа К.В. Горюнова связана с важными практическими и клинико-биологическими вопросами - созданием модели для изучения взаимовлияния МСК и лимфоцитов *in vitro* в различных условиях микроокружения, изучению механизмов бесконтактной иммуносупрессии МСК на лимфоциты, оценке вклада контактных взаимодействий в иммунорегуляторную программу МСК, а также основной проблеме – расшифровке механизмов регуляторного действия МСК на CD4 T-лимфоциты в условиях наличия или отсутствия стимуляции *in vitro*.

Автором впервые установлена роль межклеточной молекулы адгезии первого типа ICAM-1 в регуляторной программе МСК человека. Как оказалось, контактные механизмы действия МСК человека и мыши на лимфоциты различны.

В работе продемонстрировано, что именно ICAM-1 на поверхности МСК участвует в контактном механизме иммуносупрессии, связанном с регуляцией уровня CD25 на поверхности лимфоцитов.

Автором было обнаружено, что маскирование доменов поверхностных молекул ICAM-1 на МСК специфическими антителами, препятствующими связыванию не влияет на ферментативную активность и уровень синтеза индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO). Данный фермент метаболизирует триптофан в кинуренин, в так называемом кинурениновом пути обмена триптофана. Полученные данные свидетельствуют о независимом действии контактной и бесконтактной иммуносупрессии МСК.

Показано, что в присутствии активированных лимфоцитов в МСК повышается уровень мРНК и белка IDO. При этом максимальное увеличение наблюдали в условиях бесконтактной совместной инкубации МСК и Т-клеток. В условиях наличия контактов между МСК и лимфоцитов уровень синтеза IDO снижается. В присутствии неактивированных лимфоцитов индукции синтеза IDO в МСК не происходит.

В данной работе *in vitro* обнаружена способность МСК оказывать благоприятный эффект на нестимулированные интактные CD4 Т-лимфоциты, который сопровождается увеличением уровня CD25 и ICAM-1 на поверхности лимфоцитов. Это в итоге приводит к увеличению числа лимфоцитов в культуре. Однако блокирование ICAM-1 на поверхности МСК отменяет эффект поддержки Т-хелперов.

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

Диссертационное исследование основано на изучении достаточного по объему экспериментального материала – количество доноров для выделения МСК и лимфоцитов составило по 6 человек. Стимуляция лимфоцитов *in vitro* проводилась специфическими антителами к CD3 и CD28. Данный способ активно применяется в лабораторной практике и хорошо описан в литературе, позволяет получать воспроизводимые результаты. Достоинством работы являются эксперименты по совместному культивированию МСК и очищенной популяции CD3+CD4+CD45+ лимфоцитов, а также эксперименты по блокированию ICAM-1 на поверхности МСК и лимфоцитов, позволившие автору обнаружить важную роль этой молекулы адгезии в иммунорегуляторной программе МСК.

Для решения поставленных задач автором использован комплекс современных методов исследования: культивирования клеток, молекулярных, биохимических, иммунологических исследований с последующим адекватным статистическим анализом данных. Количество экспериментов, проведенных автором, является достаточным для получения достоверных данных и подтверждения наблюдаемых биологических эффектов. Сформулированные автором выводы достоверны, логически следуют из результатов, полученных в ходе исследования, и отражают их в полном объеме. Обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций сомнений не вызывает.

Значимость для науки и практики полученных автором результатов

Полученные в исследовании теоретические данные углубляют представления о молекулярно-биологических механизмах взаимодействия МСК и лимфоцитов в условиях наличия или отсутствия стимуляции Т-клеток. В рамках данной работы было подтверждено, что контактные механизмы иммуносупрессии более эффективны, чем бесконтактные, что согласуется с литературными данными.

Важным дополнением является то, что авторы впервые установили участие молекулы ICAM-1 в регуляторных механизмах действия МСК на CD4 Т-лимфоциты. При этом выяснилось, что молекула VCAM-1 не принимает участия в контактных механизмах иммунорегуляции МСК человека, в отличие от МСК мыши, где участвуют обе молекулы: ICAM-1 и VCAM-1. Помимо этого было показано, что ICAM-1 важна не только для иммуносупрессии, но и поддержки интактных Т-клеток, что подтверждает роль МСК как иммунорегуляторных, а не константных иммуносупрессорных клеток.

Конкретные рекомендации по использованию результатов и выводов работы

Отработанная автором модель совместного культивирования МСК и Т-лимфоцитов *in vitro* позволяет изучать различные молекулярно-биологические аспекты взаимовлияния двух типов клеток, а также служить основой для разработки протоколов оценки и модификации иммунорегуляторных свойств МСК *in vitro*.

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

Личное участие автора

Автором самостоятельно проведен анализ литературы по теме исследования, выделены МСК из подкожно-жировой клетчатки человека, полученной в ходе операций грыжеиссечения, а также лимфоцитов из венозной крови здоровых доноров. Автором получена очищенная популяция CD45+CD3+CD4+ Т-клеток с помощью проточного флуоресцентного сортировщика. Проведены эксперименты по совместному культивированию МСК с лимфоцитами, ценке пролиферации Т-клеток с помощью флуоресцентного красителя. Проведен анализ результатов взаимодействия с помощью проточной цитофлуориметрии, иммуноблоттинга, ПЦР в реальном времени, иммуноферментного анализа, флуоресцентной микроскопии с применением прижизненных красителей. Автор самостоятельно выполнил статистическую обработку полученных данных и их критический анализ, подготовил к печати публикации по результатам исследования.

Структура диссертации традиционная. Работа написана хорошим литературным языком, текст изложен на 134 страницах машинописного текста. Диссертация иллюстрирована 36 графиками и микрофотографиями хорошего качества, содержит 5 таблиц. Список литературы включает 311 отечественных и зарубежных источников. Такой объем литературных источников обусловлен необходимостью анализа накопленных данных о молекулярно-биологических механизмах взаимовлияния МСК и иммунных клеток *in vitro* и *in vivo*. В обзоре представлены и обсуждены работы, относящиеся как к начальным этапам изучения биологии МСК, так и последние достижения в области расшифровки молекулярных механизмов иммунорегулирующей программы МСК.

Выводы диссертации соответствуют полученным результатам и задачам исследования. Автореферат и публикации в полной мере отражают основные положения диссертации.

По материалам диссертации опубликовано 9 научных работ, из них 3 статьи в журналах, входящих в Перечень РФ 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.

Принципиальных замечаний по представленной работе нет.

При ознакомлении с работой возникли следующие замечания и вопросы.

Замечания

- В иллюстрациях автореферата используется аббревиатура ЛФ, которой нет в списке сокращений. В тексте диссертации есть оба сокращения: ЛПК – лейкоциты периферической крови, ЛФ – лимфоциты. Имеются в виду все лимфоциты, Т-, В- и ЕК? Как получали ЛФ из ЛПК?

- Целевые клетки - субпопуляцию Т-лимфоцитов с фенотипом CD45+CD3+CD4+ автор иногда обозначает как CD4 Т-хелперы, что представляется избыточным.

- Культуры клеток *in vitro* - корректнее использовать термин культивируемые клетки или клетки *in vitro*.

- В работе много внимания уделено формированию прямых контактов между МСК и Т-лимфоцитами. Однако, на представленных микрофотографиях увидеть контактирующие клетки затруднительно, поскольку приведены изображения только на малых увеличениях.

- В тексте несколько раз после описания собственных данных встречается ссылка на их совпадение с данными других авторов, например, на стр 74 с [76], на стр. 78 с [281]. В чем же тогда был смысл проводить эти эксперименты?

- Выводы излишне детализированы.

Вопросы

- Автор показал, что в присутствии МСК на нестимулированных CD4 Т-лимфоцитах увеличивается экспрессия CD25 и ICAM-1 (т.е. происходит активация) и увеличивается число лимфоцитов (т.е. стимулируется пролиферация). Можно ли полагать, что МСК проявляют

иммуностимулирующую активность в отношении интактных Т-клеток? Какое может это иметь значение при использовании МСК для клеточной терапии?

- Где на Рисунке 9 продемонстрирована зависимость уровня флуоресценции поверхностных маркеров МСК и количеством МСК? Такая зависимость вообще существует?

- Как определяли количество CD25+ клеток в экспериментах, проиллюстрированных на Рисунке 12? Почему ось У на Рисунке 12Б начинается не от 0?

- На основании чего сделано заключение о формировании прямых гетероклеточных контактов в экспериментах, проиллюстрированных на Рисунках 10 и 12а?

- Как определяли стабильность экспрессии генов домашнего хозяйства, использованных в работе?

- Рисунок 21. В подписи к Рисунку речь идет о доле ICAM-1+МСК, однако без изотипического контроля трудно определить долю окрашенных клеток.

- На основании полученных данных автор сделал предположение, что ICAM-1 важна не только для иммуносупрессии, но и поддержки интактных Т-клеток, что, по его предположению, позволяет рассматривать ICAM-1 как новую терапевтическую мишень для лечения аутоиммунных патологий и не менее опасных для организма иммунодефицитов. Хотелось бы узнать мнение автора о том, как такую распространенную в организме молекулу межклеточного взаимодействия как ICAM-1 можно использовать в качестве терапевтической мишени.

- Есть ли различия в эффектах МСК на CD4 Т-лимфоциты в составе фракции лейкоцитов периферической крови и в чистой популяции CD4+ клеток после флуоресцентного сортирования? Если да, то какой вклад вносят другие популяции ЛПК?

Заключение

Диссертационная работа Горюнова К.В. «Молекулярные механизмы регуляторного действия мезенхимных стромальных клеток на Т-лимфоциты человека», выполненная под руководством к.х.н. Рубцова Ю.П. является научно-квалификационной работой, в которой решена актуальная научная задача: установлены механизмы иммунорегулирующего влияния мезенхимных стромальных клеток жировой ткани человека на CD4+ лимфоциты *in vitro*.

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

По актуальности, новизне, теоретической и практической значимости, достоверности полученных результатов работа Горюнова К.В. соответствует требованиям п.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 наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология,

цитология, гистология, а автор заслуживает присвоения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология.

Отзыв обсужден и одобрен на заседании межлабораторного семинара ГНЦ РФ – ИМБП РАН (протокол №1 от 4 февраля 2020 года).

Ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной физиологии ГНЦ РФ – ИМБП РАН, доктор биологических наук по специальностям 03.03.01 - «Физиология», 03.03.04 - Клеточная биология, цитология, гистология

Е.Р.Андреева

123007, г. Москва, Хорошевское ш., 76а
Тел.: +7(499)195-23-01
doc@imbp.ru; <http://www.imbp.ru>



Подпись д.б.н. Андреевой Е.Р. заверяю

Ученый секретарь ГНЦ РФ ИМБП РАН, д.б.н

М.А.Левинских