

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

Работа К.В. Горюнова посвящена изучению молекулярных механизмов, опосредующих функциональное взаимодействие мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (МСК) с лимфоцитами (CD4 Т-хелперами). Автором проведена проверка гипотезы иммуномодулирующей функции МСК, обоснована важность молекул клеточной адгезии для контактной молекулярной регуляторной программы этих клеток у человека. Исследования подобного типа весьма актуальны, так как нарушение функции иммунной системы при хроническом воспалении является важной составляющей многих аутоиммунных заболеваний, в ходе которых Т-клетки распознают антиген собственного организма и запускают иммунный ответ за счет секреции воспалительных цитокинов. Эффективного лечения аутоиммунных патологий до сих пор не найдено. Обнаружение в 2002 г. у МСК иммуносупрессорных свойств открыло новое поле деятельности для исследователей – изучение механизмов иммуносупрессии и внедрение МСК в клиническую практику. Однако полученные результаты зачастую противоречат друг к другу, что мешает увидеть общую картину в целом. В связи с этим, широкое использование МСК в лечении аутоиммунных заболеваний, а также трансплантологии и ряде других отраслей современной медицины в настоящее время затруднено. Основная проблема заключается в недостаточных знаниях механизмов взаимодействия между МСК и иммунными клетками, в том числе 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, I типа, G), участвующих в этих регуляторных молекулярных механизмах, а также показано, что МСК могут осуществлять свою регуляторную функцию как

контактным, так и бесконтактным способом. При этом отдельные звенья молекулярных механизмов, реализуемых при участии вышеперечисленных молекул, остаются неизвестными. Поэтому в настоящее время не удастся предсказать поведение клеток *in vivo* при различных аутоиммунных патологиях.

В этой связи остаются актуальными исследование молекулярных механизмов взаимодействия между МСК и лимфоцитами в связи с малым количеством факторов в системе и большими возможностями контроля условий эксперимента. В работе впервые выявлены особенности экспрессии генов молекул адгезии человеческих МСК (ICAM-1, VCAM-1), изучена роль ICAM-1 на поверхности МСК и лимфоцитов в иммунорегулирующей программе МСК, получены данные, указывающие на возможность МСК поддерживать выживание интактных Т-клеток в отсутствие стимуляции. Результаты работы имеют важное фундаментальное значение для понимания биологии МСК и их взаимодействия с иммунными клетками, а также практическое применение для лечения аутоиммунных заболеваний.

Научная новизна работы

В работе впервые установлена важность молекулы межклеточной адгезии 1 типа ICAM-1 в регуляции взаимного влияния 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. Показано, что экспрессия ICAM-1 на МСК зависит от статуса активности Т-клеток.

Впервые обнаружено, что блокирование ICAM-1 на поверхности МСК человека не влияет на паракринную иммуносупрессию, реализуемую через синтез и активность индоламин-2,3-диоксигеназы – фермента, ответственного за метаболизм триптофана, необходимого активно делящимся Т-клеткам.

Впервые показано, что в отсутствие преинкубации МСК с воспалительными цитокинами в условиях взаимодействия только с активированными лимфоцитами в МСК инициируется синтез IDO, включающий экспрессию гена и продукцию полноценной белковой молекулы, обладающей ферментативной активностью.

Автор обнаружил, что ICAM-1 на поверхности МСК участвует не только в иммуносупрессии, но и в поддержке выживания интактных Т-клеток, связанной с повышением уровня поверхностной экспрессии ICAM-1 и CD25 в лимфоцитах.

Таким образом, в представленной работе дан ответ на два фундаментальных вопроса, касающихся биологии МСК: подтверждена роль МСК как иммунорегуляторных клеток, а не константных иммуносупрессоров, а также обоснована важная роль 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 описанная в литературе методика стимуляции Т-клеток с помощью специфических антител. Выбрана адекватная *in vitro* модель для изучения эффектов взаимодействия между МСК и лимфоцитами. Для решения поставленных в работе задач использовался 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 механизмов иммунорегуляции. Данные о роли МСК как об иммунорегулирующих клетках вносят вклад в теоретическую модель физиологического воспаления, подтверждают роль МСК на стадии так называемого острого воспаления и позволяют говорить об МСК как о клетках, участвующих в поддержании гомеостаза иммунной системы.

Результаты, обосновывающие важность молекулы ICAM-1 для иммунорегуляции МСК, подчеркивают необходимость обратить внимание на нее как терапевтическую мишень для аутоиммунных патологий (ревматоидного артрита, реакции трансплантата против хозяина), где показана роль контактных взаимодействий между клетками для развития заболевания.

Разработанная автором модель взаимодействия МСК и Т-лимфоцитов может быть использована как тест-система анализа иммуносупрессорной способности МСК пациентов с аутоиммунными патологиями, что поможет ответить на вопрос о перспективах использования 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 иммунодефицитами.

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. Протоколы выделения МСК и Т-лимфоцитов, описанные автором, внедрены в практику лаборатории регенеративной медицины ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава РФ

Личный вклад автора заключался в анализе литературы, получении МСК жировой ткани и лимфоцитов периферической крови, получении очищенной линии CD45CD4CD3 лимфоцитов, моделировании воспаления с помощью специфических антител и фитогемагглютинина, анализе селекции результатов, их адекватной статистической обработке, а также формулировке выводов 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 современного состояния проблемы и логично подводит читателя к изучаемым вопросам, что позволяет обосновать цель и задачи исследования. 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.

Замечания по оформлению работы.

1. На рисунок 1 имеются ссылки в тексте, однако полное объяснение приведенной схемы отсутствует.

2. В тексте замечены стилистические неточности и опечатки.

Обнаруженные недостатки незначительны и не портят общего благоприятного впечатления от прочтения диссертации.

Вопросы к диссертанту:

1. В какой среде проводили культивирование лимфоцитов и сокультивирование лимфоцитов и МСК? Как проводился подсчет количества CD25+ клеток и общего числа клеток, с помощью обработки данных проточной цитометрии или каким-либо другим способом?

3. Рисунок 22А: Меняется или нет экспрессия VCAM при сокультивировании МСК и лимфоцитов?

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 03.01.04 – биохимия
ведущий научный сотрудник лаборатории ангиогенеза
Научно-исследовательского института экспериментальной кардиологии
ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский
центр кардиологии» Минздрава РФ
121552, г. Москва, ул. 3-я Черепковская, д. 15а, стр. 7,
+7 (495) 414-67-13, info@cardioweb.ru

М.Ю. Меньшиков
6.03.2020

Меньшиков М.Ю.

Данные об оппоненте
Меньшиков Михаил Юрьевич, доктор биологических наук по специальности
03.01.04 – биохимия
ведущий научный сотрудник лаборатории ангиогенеза
Научно-исследовательского института экспериментальной кардиологии
ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский
центр кардиологии» Минздрава РФ
121552, г. Москва, ул. 3-я Черепковская, д. 15а, стр. 7
8-916-484-68-59, myumensh@mail.ru

Подпись Меньшикова М.Ю. заверяю

Ученый секретарь

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский
центр кардиологии» Минздрава РФ
доктор медицинских наук



Плеханова О.С.