

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА
Д 001.004.01 НА БАЗЕ ФГБНУ «НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ИНСТИТУТ МОРФОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА»
ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ
КАНДИДАТА БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от «18» июня 2020 г. № 7
о присуждении Горюнову Кириллу Владимировичу, гражданину Российской
Федерации ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Молекулярные механизмы регуляторного действия мезенхимных стромальных клеток на Т-лимфоциты человека» по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология принята к защите 19 декабря 2019 года (протокол №20) диссертационным советом Д 001.004.01 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт морфологии человека» (117418, г. Москва, ул. Цюрупы, д. 3), сайт организации www.morfolhum.ru, созданном в соответствии с приказом Минобрнауки России № 105/нк от 11 апреля 2012 г.

Соискатель Горюнов Кирилл Владимирович, 1989 года рождения, в 2011 году окончил биологический факультет Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» по специальности «биохимия». С 2011 по 2014 гг. обучался в аспирантуре на кафедре биохимии и молекулярной медицины Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» (факультет фундаментальной медицины) по специальности 03.01.04 – биохимия. В настоящее время соискатель работает младшим научным сотрудником в лаборатории клеточных технологий ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В. И. Кулакова»

Министерства здравоохранения РФ. Диссертация выполнена на кафедре биохимии и молекулярной медицины факультета фундаментальной медицины Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Научный руководитель: Рубцов Юрий Петрович, кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной онкологии Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Официальные оппоненты: 1. **Меньшиков Михаил Юрьевич**, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории ангиогенеза Научно-исследовательского института экспериментальной кардиологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 2. **Гольдштейн Дмитрий Вадимович**, доктор биологических наук, заведующий лабораторией генетики стволовых клеток Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова», дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр Российской Федерации – Институт медико-биологических проблем РАН Российской академии наук (ГНЦ РФ – ИМБП РАН), город Москва, в положительном отзыве, подписанном Андреевой Еленой Ромуальдовной, доктором биологических наук, ведущим научным сотрудником лаборатории клеточной физиологии, указано, что диссертация Горюнова К.В. соответствует требованиям пп. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней» (Постановление Правительства РФ от 24.09.2013 г. №842), предъявляемым к диссертациям, представленным на соискание ученой степени кандидата биологических наук, автор достоин присуждения ученой степени кандидата биологических наук по

специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология.

Соискатель имеет 9 работ, опубликованных в рецензируемых научных изданиях, 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, 1 статья, не входящая в Перечень РФ рецензируемых научных изданий, 5 публикаций – в материалах конференций. Все 9 работ Горюнова К.В. написаны в соавторстве, в одной из них соискатель является первым автором. Общий объем публикаций 75 страниц.

Наиболее значимые работы:

1. Regulation of Immunity via Multipotent Mesenchymal Stromal Cells / Rubtsov Y.P., Suzdaltseva Y.G., Goryunov K.V., Kalinina N.I., Sysoeva V.Y., Tkachuk V.A. // Acta Naturae. – 2012. – Vol. 4. – P. 23-31
2. Molecular Mechanisms of Immunomodulation Properties of Mesenchymal Stromal Cells: A New Insight into the Role of ICAM-1 / Rubtsov Y, Goryunov K, Romanov A, Suzdaltseva Y, Sharonov G, Tkachuk V. // Stem Cells Int. - 2017; 6516854. doi: 10.1155/2017/6516854747
3. Suzdaltseva Y.G. The role of intercellular contacts in induction of indolamine-2,3-dioxygenase synthesis in MMSC from adipose tissue / Suzdaltseva Y.G., Goryunov K.V., Rubtsov Y.P. / Cell and Tissue Biology. - 2018. - Vol. 12. - № 5. - P. 391–401

Недостовверные сведения об опубликованных соискателем работах, в которых изложены основные научные результаты диссертации, в диссертации отсутствуют.

На автореферат поступили отзывы: 1. От доктора биологических наук, старшего преподавателя кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет) **Паюшиной О.В.**; 2. От доктора биологических наук, заведующего

лабораторией эпигенетики ФГБУН Институт общей генетики имени Н. И. Вавилова РАН **Киселева С.Л.**

Отзывы положительные, критических замечаний в отзывах по представленной работе нет. Отзывы содержат информацию об актуальности настоящего исследования, новизне полученных результатов и значимости их для науки и практики. Отмечено, что диссертационная работа выполнена в полном объеме на высоком научном уровне, выводы диссертации достоверны и полностью соответствуют поставленным задачам.

Выбор ведущей организации обоснован тем, что в лаборатории клеточной физиологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственный научный центр Российской Федерации – Институт медико-биологических проблем Российской академии наук в течение многих лет проводятся фундаментальные исследования, посвященные изучению иммуносупрессивной активности мезенхимных стромальных клеток в условиях различной насыщенности кислородом. **Выбор официальных оппонентов обоснован** тем, что **Меньшиков Михаил Юрьевич**, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории ангиогенеза Научно-исследовательского института экспериментальной кардиологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации является одним из ведущих специалистов в области изучения регенеративного потенциала мезенхимных стромальных клеток, а также их роли в воспалении жировой ткани. **Гольдштейн Дмитрий Вадимович**, доктор биологических наук, заведующий лабораторией генетики стволовых клеток Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова» активно занимается проблемой биологии мезенхимных стромальных клеток и их терапевтического применения.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований разработана новая научная идея об участии молекулы межклеточной адгезии 1 типа (ICAM-1) в иммунорегулирующей программе мезенхимных стромальных клеток (МСК) человека. Доказано, что контактные и бесконтактные механизмы иммуносупрессорной программы МСК действуют независимо друг от друга. В проведенных экспериментах обнаружено, что МСК оказывают способствующее выживанию действие на интактные CD4 лимфоциты в отсутствии стимуляции в условиях совместного культивирования МСК и лимфоцитов.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что доказаны следующие положения: Реализуемая МСК иммунорегуляторная программа является гибкой и зависит от микроокружения: МСК способны ингибировать активацию или, наоборот, поддерживать выживание Т-клеток. При стимуляции Т-клеток специфическими антителами к CD3 и CD28 МСК из жировой ткани человека они оказывают иммуносупрессорное действие на CD4 лимфоциты, что приводит к снижению уровня поверхностного маркера CD25 на Т-клетках, которое коррелирует с замедлением скорости пролиферации лимфоцитов. При этом максимальный эффект негативного влияния МСК на стимулированные Т-лимфоциты достигается при наличии физических контактов между клетками. С помощью анализа поверхностного фенотипа МСК установлено, что запуск иммуносупрессорной программы при взаимодействии со стимулированными лимфоцитами не влияет на уровень стромальных поверхностных маркеров МСК, таких как CD90 - заякоренный белок с вариабельным иммуноглобулиноподобным доменом, CD105 - эндоглин, CD73 - экто-5'-нуклеотидаза.

Показано, что иммуносупрессорная программа запускается в МСК при взаимодействии с активированными лимфоцитами как при наличии, так и отсутствии физических контактов между этими двумя типами клеток. Негативное действие иммуносупрессорной программы связано с активностью фермента индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO), участвующего в метаболизме

триптофана. При взаимодействии с МСК бесконтактным способом блокирование активности IDO специфическим ингибитором приводит к восстановлению доли CD4CD25⁺ стимулированных Т-лимфоцитов.

Установлено, что при взаимодействии со стимулированными лимфоцитами на поверхности МСК многократно повышается уровень молекулы межклеточной адгезии 1 типа (ICAM-1), а на поверхности стимулированных лимфоцитов МСК, напротив, снижают уровень ICAM-1. При контактной инкубации в смешанной культуре МСК и стимулированных CD4 Т-лимфоцитов блокирование молекул ICAM-1 специфическими антителами на поверхности двух типов клеток приводит к восстановлению доли CD4CD25⁺ Т-клеток по сравнению с контролем.

При культивировании МСК с интактными нестимулированными CD4 Т-лимфоцитами на небольшой части популяции последних возрастает уровень поверхностных маркеров активации CD25 и ICAM-1, что приводит к двукратному увеличению числа Т-хелперов.

Применительно к проблематике диссертации результативно использован комплекс существующих базовых методов исследования: биохимические, культуральные, иммуноблоттинг, иммуноферментный и ингибиторный анализ, проточная цитофлуориметрия, полимеразная цепная реакция в реальном времени, флуоресцентная микроскопия; проведены анализ, обобщение, критическая оценка и статистическая обработка данных.

Изложены экспериментальные доказательства того, что в зависимости от условий микроокружения при взаимодействии с лимфоцитами в МСК происходит переключение между иммуносупрессорным и способствующим выживанию Т-клеток фенотипами.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что данные о регуляторной роли ICAM-1 при взаимодействии МСК и Т-лимфоцитов могут быть использованы для разработки подходов к применению ингибирующих антител к ICAM-1 в терапии различных воспалительных заболеваний.

Созданную в ходе работы *in vitro* модель изучения взаимодействия между МСК и лимфоцитами целесообразно использовать в качестве тест-системы для оценки иммуносупрессорных свойств МСК у пациентов и разработки протоколов усиления иммуносупрессорной активности МСК при проведении клеточной терапии.

Оценка достоверности результатов исследования выявила: результаты получены на сертифицированном оборудовании, показана воспроизводимость результатов исследования, использованы современные приборы и специализированные программы анализа: инвертированный микроскоп AxioVert A1 (Carl Zeiss, Германия), программа для анализа ImageJ, проточный цитофлуориметр FACS CANTO II (BD Bioscience, США), клеточный сортер FACS ARIA III (BD Bioscience, США), спектрофотометр оптического волокна NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, США), детектирующий амплификатор на 96 образцов DTprime (ДНК-Технология, Россия), камера для электрофореза (Biorad, США), камера для переноса Mini Trans-Blot® Cell (Biorad, США), ИФА-анализатор Zenyth 3100 (ANTHOS, Австрия). Статистическую обработку полученных данных проводили в программах Statistica 6.0, SIGMA PLOT.

Теория исследования построена на известных данных о том, что МСК человека обладают иммуносупрессорными свойствами по отношению к Т-лимфоцитам, при этом известно, что наличие физических контактов между клетками вносит дополнительный вклад в иммуносупрессию со стороны МСК. При этом в литературе присутствуют данные о возможной роли МСК в поддержании выживания нестимулированных Т-лимфоцитов; **идея базируется** на анализе данных других авторов о том, что для МСК мышей показана важная роль молекул межклеточной адгезии ICAM-1 и VCAM-1 в реализуемой иммуносупрессорной программе МСК, а МСК человека в этом аспекте не изучены. **Использовано** сравнение собственных результатов и данных, полученных ранее другими исследователями по тематике, посвященной роли молекул межклеточной адгезии в регуляторном действии

МСК на Т-лимфоциты. Установлено совпадение части полученных результатов с данными, представленными в независимых источниках по изучаемой тематике для МСК грызунов, в частности, показана роль ICAM-1 в иммуносупрессорной программе МСК человека, однако VCAM-1 в, отличие от МСК грызунов, в иммуносупрессии участия не принимает. Помимо этого, впервые показано, что ICAM-1 на поверхности МСК человека важен для поддержки выживания интактных лимфоцитов. Используются репрезентативные опытные и контрольные группы клеток, а также современные методики сбора и анализа полученных результатов, проведено достаточное для подтверждения выводов количество экспериментов.

Личный вклад соискателя состоит в: анализе литературы и определении научной проблемы, планировании исследования, получении клеток из первичного материала, проведении эксперимента, обработке и анализе результатов, статистическом анализе данных, интерпретации результатов и подготовке публикаций по выполненной работе.

На заседании 18 июня 2020 г. диссертационный совет принял решение присудить Горюнову К.В. ученую степень кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология. При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 18 человек, из них 7 докторов наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология, из 21 человека, входящего в состав совета, проголосовали: за – 18, против – нет, недействительных бюллетеней – нет.

Председатель диссертационного совета Д 001.004.01
профессор д.м.н.

Л.М. Михалева

Ученый секретарь диссертационного совета Д 001.004.01
д.б.н.

А.М. Косырева

« 19 » июня 2020 г.

