

## **ОТЗЫВ**

на диссертацию Лохониной Анастасии Вячеславовны «Сравнительная характеристика иммунофенотипических и функциональных свойств макрофагов эмбрионального и костномозгового происхождения», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология.

### **Актуальность темы выполненной работы.**

В настоящее время в биологии и медицине ведется значительное количество исследований по проблемам регенерации и повышения эффективности стимуляции репаративных процессов в поврежденных органах и тканях. Одним из многообещающих направлений регенеративной медицины являются клеточные технологии. При этом в качестве терапевтического агента используют разнообразные типы клеток: эмбриональные стволовые клетки, мультипотентные стромальные клетки, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки и другие. В последнее время внимание исследователей обращено на макрофаги, как на одну из возможных и перспективных популяций для применения в клеточной терапии, т.к. макрофаги являются ключевыми регуляторами тканевого гомеостаза, как в нормальных условиях, так и при репаративных процессах.

Сложность использования макрофагов в клеточных технологиях заключается в крайней гетерогенности этой популяции. В организме человека по последним данным различают как минимум две популяции клеток макрофагального ряда, имеющих, однако разное происхождение. Установлено, что резидентные макрофаги органов развиваются из гемопоэтических клеток-предшественников стенки желточного мешка, тогда как большая часть макрофагов дермы кожи и слизистых оболочек имеет костномозговое происхождение. Причины такого распределения клеток в организме до конца неизвестны. Кроме того, каким образом источник происхождения макрофагов отражается на их функции также мало изучено.

В связи с актуальностью применения макрофагов для направленной регуляции гомеостаза в органах и тканях целью диссертационной работы

Лохониной А.В. стало выявление особенностей функционирования макрофагов, происходящих из разных источников: костномозговых макрофагов, полученных из моноцитов крови и резидентных макрофагов печени – клеток Купфера, имеющих эмбриональное происхождение.

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

В данной работе впервые проведено комплексное сравнительное исследование молекулярно-биологических, иммунофенотипических и функциональных характеристик макрофагов из разных источников происхождения (костномозговых и эмбриональных) и при полярных функциональных состояниях: активированных по провоспалительному фенотипу M1 и по противовоспалительному пути M2.

В ходе выполнения работы были на основе данных литературы оптимизированы и применены протоколы получения первичных клеточных культур макрофагов. Автором показано, что неактивированные макрофаги костномозгового происхождения на высоком уровне экспрессируют маркеры провоспалительного фенотипа – костимулятор Т-лимфоцитов CD86 и индуцируемую синтазу оксида азота, в то время как макрофаги эмбрионального происхождения на высоком уровне экспрессируют маннозный рецептор CD206 – маркер противовоспалительного фенотипа.

В данной работе достаточно подробно изучен паттерн экспрессии генов цитокинов, регулирующих воспаление. Автором показано, что для макрофагов эмбрионального и костномозгового происхождения характерен разный спектр экспрессии генов сигнальных молекул, ответственных за воспаление. Неактивированные и поляризованные резидентные макрофаги печени вне зависимости от направления поляризации (M1 или M2) экспрессируют гены противовоспалительных цитокинов *Il4*, *Il10*, *Il13*, *Arg1*, макрофаги – производные моноцитов крови в тех же условиях на более высоком уровне по сравнению с клетками Купфера экспрессируют гены провоспалительных цитокинов *IL1β*, *IL12a*, *TNFα*, *iNOs*.

На *in vitro* модели поляризации, разработанной автором на основе протоколов, описанных в литературе, показано что активация в направлении M1-

или M2 фенотипа макрофагов из разных источников происхождения сопровождается сменой функциональной программы клеток, состава поверхностных и внутриклеточных маркеров, а также спектра продуцируемых сигнальных молекул и экспрессируемых генов.

Стоит отметить, что при анализе полученных результатов автор сделал вывод о том, что полученные данные свидетельствуют о несостоятельности M1/M2 концепции в отношении классификации макрофагов эмбрионального и костномозгового происхождения. В проведенном исследовании было установлено, что фенотип и функциональные свойства клеток динамически изменяются в зависимости от условий микроокружения. Результаты данной работы подтверждают гипотезу о существовании фенотипического и функционального спектра макрофагов, который определяется условиями среды.

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

В данной работе определена проблема, объект и предмет исследования, корректно сформулированы положения и выводы. Используемые автором методы соответствуют поставленным задачам исследования. Результаты проведенных исследований с использованием современных молекулярно-биологических, иммуноцитохимических и гистологических методов были корректно оценены с помощью методов компьютерной морфометрии и статистической обработки данных. При постановке исследования каждая экспериментальная группа состояла из достаточного количества образцов и адекватно выбранных групп контроля. С учетом вышеперечисленного полученные автором данные являются обоснованными и достоверными, а сформулированные выводы в диссертации адекватными.

Анализ литературы по изучаемой проблеме выполнен с достаточным количеством источников (186 российских и зарубежных источников) и состоит из глав, посвященных классификациям макрофагов по источнику происхождения и функциональным свойствам, полной и подробной характеристике изучаемых в ходе работы клеток. Автором тщательно проанализированы имеющиеся данные по исследуемой проблеме.

### **Значимость для науки и практики полученных автором результатов**

Основные положения диссертационной работы посвященной изучению иммунофенотипических и функциональных свойств макрофагов из разных источников происхождения имеют как фундаментальное, так и прикладное значение. Полученные данные могут использоваться при обучении студентов, аспирантов, ординаторов биологических и медицинских вузов.

Выявленные автором особенности функциональной пластичности макрофагов, а также молекулярно-биологические, иммунофенотипические и функциональные характеристики этих клеток представляют практический интерес. Полученные данные целесообразно использовать при их активации макрофагов как *in situ*, так и *ex vivo* по провоспалительному или противовоспалительному пути для применения в качестве терапевтического инструмента в регуляции клеточного гомеостаза при лечении воспалительных и онкологических заболеваний человека.

#### **Конкретные рекомендации по использованию результатов и выводов работы. Общая оценка диссертационной работы**

Работа изложена грамотным научным языком на 146 страницах машинописного текста и содержит 6 таблиц и 46 рисунков. Выводы диссертации сформулированы корректно и отражают все содержание работы. Достоверность данных подкреплено достаточным объемом исследований и адекватностью использованных *in vitro* моделей. Результаты проделанной работы оценены с использованием корректной статистической обработкой. Автореферат изложен на 24 страницах и отражает основные положения диссертации.

Основные результаты диссертационной работы опубликованы в 12 работах, из них 6 статей в журналах, входящих в перечень рецензируемых научных журналов и изданий, рекомендованных ВАК Минобрнауки. Результаты проведенных исследований были доложены на международных и российских научных конференциях.

Принципиальных замечаний по представленной работе нет. Имеются замечания общего характера.

1. В разделе «Обсуждение полученных результатов» автором обсуждаются методические подходы и описанные в литературе протоколы, было бы целесообразней отнести это в раздел «Материалы и методы».

2. Также в разделе «Обсуждение полученных результатов» не хватает обсуждения механизмов обнаруженных различий и особенностей.
3. Более правильно говорить не М1- или М2-активирующие среды, а указывать только факторы, которые были в этих средах.
4. В разделе «Результаты собственных исследований» даже если описываемые результаты статистически значимо не отличаются, все равно было бы хорошо представлять графики с указанием количества измерений.
5. В работе отсутствует описание критериев оценки ультраструктурных изменений.
6. Описание ультраструктурных особенностей представлено без количественного анализа.
7. В работе отсутствуют критерии оценки округлости и отросчатости формы изучаемых клеток.

При изучении диссертации выявлены вопросы, которые можно обсудить в порядке дискуссии при защите работы:

1. Почему был выбран срок оценки иммунофенотипа на седьмые сутки культивирования?
2. Какая была выживаемость клеток на седьмые сутки культивирования?
3. Почему не прикрепившиеся к пластику клетки убирали из культуры на вторые сутки, если согласно данным литературы, макрофаги прикрепляются уже в течение часа и даже в безсырьевой среде.
4. Из раздела «Материалы и методы» осталось неясно добавляли или нет факторы к моноцитам для дифференциации до макрофагов?
5. Каким образом доказывали, что полученные описанным методом клетки являлись моноцитами?

## **Заключение**

Диссертационная работа Лохониной А.В. «Сравнительная характеристика иммунофенотипических и функциональных свойств макрофагов эмбрионального и костномозгового происхождения», выполненная под руководством д.м.н., доцента Фатхудинова Т.Х., является научно-квалификационной работой, в которой решена

научная задача - охарактеризованы иммунофенотипические, морфологические и функциональные свойства макрофагов из разных источников происхождения. Результаты диссертационной работы имеют большое научно-практическое значение для клеточной биологии, цитологии, гистологии, биологии развития и регенеративной медицины.

Диссертационная работа Лохониной А.В. соответствует требованиямпп.9 - 14 «Положения о присуждении ученых степеней» ВАК Минобрнауки РФ (Постановление Правительства РФ от 24.09.2013 г.№842 в редакции от 28.08.2017 №1024), предъявляемым к диссертациям, представленным на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология. При этом автор заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология.

Доктор медицинских наук по специальности  
14.03.03 Патологическая физиология,  
профессор, заведующий кафедрой патологической физиологии,  
заведующий лабораторией клеточных биотехнологий  
ФГБОУ ВО «Московского государственного медико-стоматологического  
университета имени А.И. Евдокимова»

Игорь Юрьевич Малышев

01.12.2020

Подпись Малышева И.Ю.

заверяю \_\_\_\_\_

Ученый секретарь МГМСУ

профессор, д.м.н. Васюк Ю.А.

