

ОТЗЫВ

**официального оппонента
на диссертационную работу**

Капранова Николая Михайловича «Взаимодействие мультипотентных мезенхимных стромальных клеток с лимфоцитами», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.01.21 – гематология и переливание крови

Актуальность темы исследования

Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (МСК) используются в многочисленных протоколах клинических исследований для лечения различных заболеваний и патологий. В частности, их иммуномодулирующие свойства могут быть востребованы в терапии аутоиммунных заболеваний и реакции трансплантат против хозяина после трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток. Однако механизм иммуномодулирующего действия МСК недостаточно изучен. Большинство клинических протоколов предполагают внутривенное введение этих клеток. Очевидно, что при данном способе введения МСК встречаются в кровотоке с лимфоцитами и взаимодействуют с ними. Многие международные группы, занимающиеся исследованиями МСК, предполагают, что именно межклеточное взаимодействие определяет изменение иммунных процессов при введении МСК. Кроме того, известно, что МСК секретируют целый ряд цитокинов, также влияющих на регуляцию иммунного ответа. Таким образом, детальное изучение изменений, происходящих с лимфоцитами и самими МСК при их взаимодействии, которому посвящена работа Капранова Н.М., отвечает на актуальные вопросы биологии МСК и возможности их использования в клеточной терапии.

Научная новизна исследования

Полученные в работе Капранова Н.М. данные об активации экспрессии молекул главного комплекса гистосовместимости 1 и 2 класса на МСК при их взаимодействии с лимфоцитами представляют огромный интерес. Во-первых, эти данные заставляют более тщательно рассматривать вопрос выбора источника МСК. В большинстве клинических исследований используются МСК стороннего донора, поскольку считалось, что эти клетки неиммуногенны. Известно, что при

внутривенном введении МСК обнаруживаются в организме в течение нескольких дней, затем полностью элиминируются. В клинических исследованиях не было зафиксировано иммунной реакции на введение МСК, однако данные, полученные Капрановым Н.М. позволяют предположить, что длительность присутствия МСК в организме и, соответственно, их эффективность, могут зависеть от различий по антигенам гистосовместимости.

Вместе с тем Капрановым Н.М. показано, что изменения, происходящие с МСК и лимфоцитами, имеют одинаковую направленность, независимо от того, сокультивировали МСК с аутологичными или аллогенными лимфоцитами. То есть, попадая в организм, МСК в любом случае экспрессируют антигены главного комплекса гистосовместимости, разница состоит в том, распознает ли организм эти МСК как «чужие».

В работе показано, что при сокультивировании с МСК изменяется субпопуляционный состав лимфоцитов в сторону увеличения числа наивных и уменьшения числа эффекторных клеток, чем можно объяснить иммуномодулирующее действие МСК.

На основании данных, полученных при сокультивировании МСК и лимфоцитов, удалось разделить МСК на две группы по чувствительности к нестимулированным лимфоцитам. Возможно, это разделение будет иметь значение для оценки клинической эффективности МСК.

Обоснованность используемых методов

В работе использованы современные методические подходы клеточной физиологии, позволяющие наиболее полно ответить на поставленные вопросы. Культивирование МСК проводилось по стандартной методике, полностью соответствующей применяемым при получении клеток для клинических исследований, что позволяет обосновано экстраполировать полученные результаты на данные клетки. Для количественной и качественной оценки изменений в лимфоцитах и МСК использовано иммунофенотипирование методом проточной цитофлуорометрии, адекватность выбора которого не вызывает сомнений.

Достоверность результатов и обоснованность выводов

Достоверность результатов достигнута за счет достаточно большой выборки, многократного повторения экспериментов, адекватного подбора инструментов статистической обработки данных. В результате работы сделано 5 выводов, логично вытекающих из полученных результатов и их обсуждения.

Положения, вынесенные на защиту, весомы, подтверждены полученными результатами и носят фундаментальный характер.

Практическая значимость полученных результатов

Полученные результаты об активации экспрессии антигенов главного комплекса гистосовместимости на МСК при их взаимодействии с лимфоцитами свидетельствуют о необходимости рекомендовать при возможности использовать для клеточной терапии аутологичные МСК. Выявленное разделение МСК на две группы по эффекту взаимодействия с лимфоцитами требует дальнейшего изучения и сопоставления с клиническими данными, поскольку этот признак может оказаться решающим для их клинической эффективности.

Структура диссертации

Диссертационная работа построена по стандартному типу, оформлена в соответствии с требованиями государственного стандарта. Она состоит из введения, трех глав, заключения, выводов, списка литературы, списка сокращений и условных обозначений. Работа изложена на 137 страницах, содержит 21 таблицу и 38 рисунков. Текст представляет из себя детализованное, последовательное и логичное изложение работы.

Во введении подробно обоснованы актуальность, научная новизна, теоретическая и практическая значимость исследования, сформулированы цель и задачи работы, определены положения, выносимые на защиту, описана структура диссертации.

В первой части обзора литературы собраны данные об известных свойствах и характеристиках МСК. Далее описан мировой опыт их клинического применения, указаны основные проблемы и противоречия, связанные с изучением МСК и их клиническим применением. Собраны данные об эффектах обработки МСК

интерфероном гамма. Обобщены представления о субпопуляциях Т-лимфоцитов и описаны опубликованные исследования о взаимодействии МСК с лимфоцитами.

В главе «Материалы и методы» детально описаны протокол получения МСК, характеристики доноров, из костного мозга которых получали МСК, протоколы обработки МСК интерфероном гамма и сокультивирования МСК с лимфоцитами, а также иммунофенотипические исследования клеток методом проточной цитофлуориметрии и использованные методы статистической обработки. Методы исследования позволяют представить объем выполненной работы, тщательность проведенных экспериментов. Методы статистики полностью адекватны поставленным задачам.

Результаты и обсуждение объединены в одной главе, содержат исчерпывающие данные о полученных результатах. Подробно описана динамика изменения маркеров CD90, CD73, CD105, костимуляторных молекул CD80 и CD86, негативных регуляторов Т-клеточного ответа FAS-L и PD-L1, молекул адгезии CD54 и CD146 на МСК. Изучено изменение экспрессии молекул главного комплекса гистосовместимости 1 и 2 класса - HLA-ABC и HLA-DR - на МСК. Приведены данные об изменениях субпопуляционного состава лимфоцитов при сокультивировании с МСК. Описаны изменения поверхностных маркеров на МСК при обработке клеток интерфероном гамма и изменения, происходящие при сокультивировании обработанных клеток с лимфоцитами. Проанализированы результаты взаимодействия МСК с аутологичными и аллогенными лимфоцитами. Обосновано разделение МСК на 2 группы в зависимости от их способности увеличивать долю HLA-DR+клеток среди лимфоцитов при сокультивировании и описаны характеристики обеих групп.

Представленные данные и их обсуждение логично приводят к заключению и пяти выводам, сделанным в результате работы.

Все использованные сокращения приведены списком в конце текста. Список литературы включает 191 источник, из них 4 в отечественных журналах.

Автореферат полностью отражает содержание диссертационного исследования.

При ознакомлении с работой возникли некоторые замечания и вопросы.

В автореферате диссертации нет ссылок на исследования других авторов ни в содержательной, ни в методической частях.

В материалах и методах указано, что аллогенные лимфоциты, использованные в работе, принадлежали одному стороннему донору. С одной стороны, это обосновано необходимостью стандартизации, но, с другой стороны, как можно при этом исключить индивидуальные особенности этого донора? Например, его лимфоциты могли бы оказаться устойчивыми к действию МСК?

Для исследования выделяли моноклеарную фракцию из периферической крови, которая содержала лимфоциты и моноциты. Далее анализировали результаты взаимодействия МСК и лимфоцитов. Какой вклад, по мнению автора, могут вносить моноциты в исход этого взаимодействия?

Автор обнаружил увеличение экспрессии молекул главного комплекса гистосовместимости на МСК при взаимодействии с лимфоцитами. Как это влияло на жизнеспособность МСК и их морфологию?

В работе показано, что МСК от разных доноров отличаются по способности стимулировать экспрессию HLA-DR на лимфоцитах. Известно ли что-нибудь о продукции иммуносупрессивных молекул в этих МСК?

Указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Капранова Николая Михайловича «Взаимодействие мультипотентных мезенхимных стромальных клеток с лимфоцитами» является законченным самостоятельно выполненным оригинальным научным трудом, имеющим как научное, так и практическое значение для гематологии и клеточной

терапии. Тема диссертации крайне актуальна, новизна полученных результатов бесспорна, достоверность выводов не вызывает сомнения. Таким образом работа Капранова Николая Михайловича соответствует п.9 «Положения о присуждении ученых степеней №842 от 24 сентября 2013 г. (в редакции постановления Правительства Российской Федерации от 01 октября 2018 г. № 1168 «О внесении изменений в Положение о присуждении ученых степеней»). Автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.01.21 – гематология и переливание крови.

Андреева Елена Ромуальдовна

доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник,

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр Российской Федерации — Институт медико-биологических проблем Российской академии наук

123007, г.Москва, Хорошевское ш., 76а

Тел.: +7(499)195-23-01

E-mail: andreeva_er@mail.ru

Специальности, по которым защищена диссертация: 03.03.01 - «Физиология», 03.03.04 - Клеточная биология, цитология, гистология

«23» марта

2020 г.

Е.Р. Андреева

Подпись сотрудника ГНЦ РФ - ИМБП РАН Андреевой Е.Р.
удостоверяю:



Ученый секретарь

М.А.Левинских