

ОТЗЫВ

официального оппонента, кандидата биологических наук,

Логашенко Евгении Борисовны,

на диссертацию Максимовой Александры Александровны

«Характеристика функциональных фенотипов и фиброгенной активности макрофагов человека *in vitro*», представленную на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.09 – Клиническая иммунология, аллергология

Актуальность избранной темы

Работа Максимовой А.А. посвящена исследованию функциональной активности макрофагов человека и их фибромодулирующих свойств. Гетерогенность и пластичность данной клеточной популяции обуславливает широкий спектр функций, которые выполняют данные клетки. Способность макрофагов формировать различные функциональные фенотипы под влиянием дифференцировочных и поляризующих сигналов широко описана в научной литературе, однако имеется ряд нерешенных вопросов. Первый – ограниченность данных преимущественно оппозитными M1 и M2a подтипами, и второй – отсутствие специфических маркеров для идентификации фенотипа макрофагов человека. Наконец, в подавляющем большинстве исследований для получения M1 и M2 фенотипов используют разные дифференцировочные факторы (GM-CSF для M1 и M-CSF для M2), что действительно приводит к образованию двух наиболее оппозитных фенотипов. Однако такой подход не позволяет проанализировать роль дифференцировочных/поляризующих сигналов в формирование того или иного функционального фенотипа.

Фибротический процесс является частью патогенеза множества патологических состояний, включая цирроз печени, идиопатический фиброз легких, фиброз почек, а также осложнения коронавирусной инфекции COVID-19. Тем не менее, на сегодняшний день не существует достаточно эффективных способов борьбы с развитием фиброза. Одним из перспективных подходов к лечению данных состояний как раз является стимуляция определенных типов макрофагов, которые, как было показано, являются ключевыми клетками-регуляторами фиброгенеза, благодаря своей способности деградировать внеклеточный матрикс и регулировать функциональную активность фибробластов. Основные работы по изучению про- и антифиброгенных свойств макрофагов были выполнены на экспериментальных животных, при этом роль различных функциональных фенотипов макрофагов человека и механизмы их регуляторного влияния на фибротический процесс остаются практически неизученными. Все вышеперечисленное определяет актуальность диссертационного исследования.

Оценка содержания диссертации и ее завершенность

Диссертационная работа Максимовой А.А. построена по традиционной схеме и состоит из Введения, Обзора литературы, Материалов и методов исследований, Результаты исследований, Обсуждения полученных результатов, Заключение, Выводов, Списка сокращений и Списка литературы. Работа изложена на 121 странице машинописного текста, содержит 3 таблицы и 23 рисунка. Список литературы включает в себя 210 литературных источников, в том числе 207 иностранных.

Во Введении автор формулирует цели и задачи своей работы, обосновывает актуальность исследования, оценивает научную новизну и потенциальную практическую значимость результатов, формулирует положения, выносимые на защиту.

Глава 1, содержащая обзор литературы, посвящена результатам исследований прошлых лет, касающимся функциональным фенотипам макрофагов и их роли в регуляции фибротических процессов. Данная глава раскрывает необходимость исследования свойств макрофагов человека в присутствии различных дифференцировочных и поляризующих сигналов. Во второй части литературного обзора, касающейся участия макрофагов в фиброгенезе, подчеркивается ограниченность исследований, выполненных на макрофагах человека, что обуславливает актуальность и новизну работы.

Глава 2, содержащая описание материалов и методов исследования, подробно описывает научно-методологические подходы, примененные автором для решения поставленных задач и достижения цели исследования. Представлена схема генерации макрофагальных фенотипов и методы их характеристики. Указаны методы статистики, соответствующие дизайну исследования. Все методики, использованные в исследовании, детально прописаны и пояснены, что предоставляет возможность воспроизведения экспериментов по приведенным протоколам.

Глава 3, описывает данные, полученные автором в ходе исследования. Глава включает в себя два больших раздела. Первая часть посвящена генерации и характеристике макрофагов различных функциональных фенотипов, включая морфологию, фенотип, секрецию цитокинов и хемокинов и аллостимуляторную активность. Параллельно идет сравнение макрофагов, дифференцированных M-CSF и GM-CSF, что позволяет оценить вклад не только поляризующего, но и дифференцировочного стимула в формирование функционального фенотипа клеток.

Вторая часть главы описывает возможные механизмы влияния макрофагов на фиброгенез и внеклеточный матрикс, в частности. Участие макрофагов в фиброгенезе определяется с двух позиций – прямое воздействие на внеклеточный матрикс (продукция протеаз, собственная продукция коллагена) и опосредованное через регуляцию активности фибробластов (пролиферация и дифференцировка). Кроме того, автором также

исследована продукция макрофагами ростовых факторов, которые играют важную роль в процессе фиброгенеза, таких как TGF- β 1, VEGF, ангиогенин.

Описанные результаты хорошо демонстрируют логику исследования и проиллюстрированы рисунками и таблицами, которые облегчают восприятие материала.

Глава 4 содержит анализ данных, полученных автором, а также их сопоставление с таковыми, описанными в литературе. В данной главе проводится аргументированное объяснение полученных результатов в соответствии с имеющимися на сегодняшний день представлениями.

В Заключении автор подводит итог проведенной работе и резюмирует полученные результаты.

В результате автор формулирует 5 выводов, логично вытекающих из поставленных целей и полученных результатов.

Достоверность полученных результатов подтверждается статистической обработкой данных с использованием корректно подобранных критериев и тестов. Выводы основываются на фактически полученном автором материале и отражают суть проведенного экспериментального исследования. Автор выносит на защиту два научных положения, логично вытекающих из анализа результатов исследования. Обоснованность научных положений и выводов не вызывает сомнений. Материал, представленный в диссертации, получен и проанализирован автором исследования лично либо при его непосредственном участии.

Научная новизна, теоретическая и практическая значимость

Научная новизна работы не вызывает сомнений. Автором впервые показано, что M-CSF-дифференцированные макрофаги в ответ на провоспалительные стимулы (LPS/IFN γ) отличаются более низким уровнем экспрессии M1-ассоциированного маркера (CD86) и продукции IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-17, TNF α по сравнению с GM-CSF-дифференцированными M1. Продемонстрировано, что в ответ на противовоспалительные поляризующие стимулы (IL-4, дексаметазон, эффероцитоз) макрофаги демонстрируют высокий уровень экспрессии M2-ассоциированных маркеров (CD163, MerTK) и низкий – по сравнению с M1 – уровень продукции IL-1 β , IL-2, IL-6, IFN γ вне зависимости от условий дифференцировки (M-CSF/GM-CSF). Автором впервые показано, что макрофаги M2 фенотипа независимо от дифференцировочного (M-CSF/GM-CSF) и поляризующего (IL-4, дексаметазон, эффероцитоз) стимула отличаются от оппозитного M1 фенотипа более низкой способностью стимулировать пролиферативный ответ аллогенных Т-лимфоцитов. Установлено, что M-CSF-дифференцированные макрофаги, независимо от дальнейшей поляризации, характеризуются высоким уровнем продукции матричной металлопротеиназы 9 (MMP-9), крайне низким уровнем TIMP-1 и высоким соотношением MMP-9/TIMP-1, в то время как GM-CSF-дифференцированные макрофаги отличаются

низким соотношением MMP-9/TIMP-1, величина которого варьирует в зависимости от поляризирующего стимула (максимум - M2c(Dex) и минимум - M2(LS)). Получены новые данные о том, что макрофаги человека различных функциональных фенотипов способны продуцировать коллаген I типа, и выявлена зависимость уровня секреции коллагена от условий дифференцировки (M-CSF/GM-CSF). Продemonстрировано, что среди M-CSF-дифференцированных макрофагов наиболее активными продуцентами коллагена I типа являются M2c(Dex) и M2a(IL-4), среди GM-CSF-дифференцированных – M2(LS). Показано, что M2(LS) проявляют характерную для M2 фенотипа низкую аллостимуляторную активность, при этом отличаются от других M2 клеток более высоким уровнем продукции TGF- β 1, фактора роста эндотелия сосудов и ангиогенина. Впервые продемонстрировано стимулирующее влияние растворимых факторов различных фенотипов GM-CSF-дифференцированных макрофагов на пролиферативный ответ дермальных фибробластов, причем уровень стимуляции достигает максимума в присутствии M2c(Dex). Установлен стимулирующий эффект растворимых факторов макрофагов на дифференцировку фибробластов, в частности, экспрессию α -SMA и продукцию коллагена I типа дермальными фибробластами, с наиболее выраженным эффектом в случае M2(LS).

Научная значимость исследования несомненна, поскольку исследование расширяет знания о пластичности макрофагов человека, в частности, изменении их функционального фенотипа в зависимости от дифференцировочного (M-CSF или GM-CSF) и поляризирующего стимулов (LPS, IFN- γ , IL-4, дексаметазон, эффероцитоз). Полученные автором работы результаты раскрывают степень вовлеченности дифференцировочных и поляризирующих сигналов в модуляцию про-/антифиброгенных свойств макрофагов и существенно дополняют данные о регуляторном влиянии различных функциональных фенотипов макрофагов на фиброгенез. Теоретическая значимость диссертационной работы также заключается в характеристике макрофагов, поляризованных в M2 направлении в результате взаимодействия с апоптотическими клетками, для которых был продемонстрирован высокий профиброгенный потенциал, опосредуемый продукцией TGF- β 1, TIMP-1 и коллагена I. Значение работы в прикладном аспекте заключается в определении нового метода идентификации M1/M2 подтипов макрофагов, основанном на универсальном интегральном показателе этих клеток - аллостимуляторной активности, то есть способности стимулировать пролиферацию аллогенных Т клеток в смешанной культуре лейкоцитов. На основании представленных в диссертации данных получен патент РФ.

**Степень достоверности и обоснованности результатов, выводов и положений,
выносимых на защиту**

Достоверность полученных результатов определяется продуманным дизайном исследования, подтверждается использованием различных подходов

автоматизированной оценкой результатов, а также современными методами статистической обработки результатов.

Основные положения диссертации доложены и обсуждены на отчетных конференциях аспирантов и ординаторов НИИФКИ (Новосибирск, 2017, 2019, 2020), Объединенном иммунологическом форуме-2019 (Новосибирск, 2019 г), Конгрессе молодых ученых «Актуальные вопросы фундаментальной и клинической медицины» (Томск, 2020 г). Аprobация диссертации состоялась 3 июня 2021 г на семинаре клинического отдела НИФКИ.

В работе можно отметить некоторое количество замечаний.

Так, в разделе Обзор литературы приведено всего 3 рисунка и 3 таблицы, что несколько затрудняет восприятие материала. В таблицах перечисляется большое количество маркеров, цитокинов и хемокинов, характеризующих различные фенотипы, некоторые из которых присущи нескольким группам, а некоторые индивидуальны. Для восприятия информации было бы удобно, если бы автором каким-то образом выделил именно индивидуальные параметры.

В разделе Обсуждения результатов, в некоторых местах идет довольно подробное описание результатов, полученных другими исследователями (что более уместно в разделе Обзор литературы), которое заканчивается словами «как и в нашем исследовании». Логичнее бы было привести сначала детальный анализ данных, полученных автором, а лишь затем провести параллель с таковыми, известными в мировой литературе.

Тем не менее, сделанные замечания имеют дискуссионный характер, не снижают научной ценности полученных результатов и сделанных выводов и ни в коей мере не умаляют хорошего впечатления от работы.

При прочтении работы возникли следующие вопросы:

В работе были получены макрофаги, названные M2(LS). Нигде в работе, включая раздел обзор литературы, этот тип не описан. Генерируются M2(LS) макрофаги в присутствии GM-CSF, являющегося стимулом поляризации M1 фенотипа. Почему автор относит этот тип к M2 макрофагам и что можно про них рассказать?

В работе проведен эксперимент по измерению секреции цитокинов дополнительно стимулированными, уже дифференцированными M1 и M2 макрофагами с помощью LPS. Каков смысл этого эксперимента и какие выводы можно сделать по его результатам?

Заключение

Кандидатская диссертация Максимовой Александры Александровны «Характеристика функциональных фенотипов и фиброгенной активности макрофагов человека *in vitro*», выполненная под руководством доктора медицинских наук Шевела

Екатерины Яковлевны, является законченной научно-квалификационной работой, в которой представлена характеристика функциональных фенотипов макрофагов человека. Работа выполнена на достойном методическом уровне, получены результаты, обладающие высокой научно-практической значимостью, решена актуальная для иммунологии задача – изучены и проанализированы особенности функциональных фенотипов макрофагов человека, генерируемых под влиянием различных дифференцировочных (M-CSF и GM-CSF) и поляризирующих (LPS, IL-4, дексаметазон, эффероцитоз) сигналов, а также определены их фиброгенные свойства.

Диссертационная работа Максимовой Александры Александровны по актуальности темы, научно-методическому уровню, теоретической и практической значимости соответствует требованиям п.п. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г., №842, в редакции постановления Правительства от 21.04.2016 г. № 335, постановления Правительства от 01.10.2018 г. № 1168 и Приказа Минобрнауки России от 7.06.2021 г. № 458), предъявляемым к диссертации на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.09 – Клиническая иммунология, аллергология.

Официальный оппонент,

Кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биохимии нуклеиновых кислот Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт химической биологии и фундаментальной медицины» Сибирского отделения Российской академии наук (ИХБФМ СО РАН).

Е.Б. Логашенко



23.11.2021

Адрес организации: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук.

Адрес: 630090, Россия, г. Новосибирск, проспект Лаврентьева 8.

www.niboch.nsc.ru, e-mail: evg_log@niboch.nsc.ru, +7(913)-911-3243

Подпись к.б.н. Е.Б.Логашенко заверяю



Г.Е. Пестряков

М.П.

Ученый секретарь ИХБФМ СО РАН,

Кандидат химических наук