

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор федерального государственного  
бюджетного научного учреждения  
«Томский национальный исследовательский  
медицинский центр Российской академии наук»  
член-корреспондент РАН,  
доктор биологических наук, профессор  
В.А. Степанов  
«08» ноября 2021г.

### ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук» на диссертационную работу 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 темы диссертационной работы

В последние годы возрос интерес к клеткам моноцитарно-макрофагального ряда, в связи с установлением широчайшего спектра их активности, как эффекторной так и регуляторной, и при этом наличия функциональной пластичности, что делает их перспективными объектами для изучения как ключевого участника патологических процессов разного генеза. Диссертационная работа Максимовой Александры Александровны посвящена изучению различных функциональных фенотипов макрофагов человека, генерированных из моноцитов периферической крови. Идентификация различных подтипов макрофагов у человека в силу отсутствия специфических маркеров, затруднена. Кроме того, в подавляющем большинстве работ исследователи ограничиваются изучением оппозитных подтипов – M1 и M2a, в то время как другие функциональные фенотипы охарактеризованы недостаточно. Более того, недостаточно исследованы механизмы реализации

про/антифиброгенной активности макрофагов. Поскольку в настоящее время лечение заболеваний, связанных с нарушением фиброгенеза является затруднительным (как недостаточность, сопровождающая образование хронических ран, так и избыточное отложение внеклеточного матрикса с развитием фиброза органов), изучение влияния различных функциональных фенотипов макрофагов, основных клеток-регуляторов фиброгенеза, на функциональную активность фибробластов представляется, несомненно, актуальным.

### **Научная новизна работы**

Научная новизна диссертационной работы Максимовой А.А. определяется получением новых знаний о влиянии разных дифференцировочных и поляризующих стимулов на функциональный фенотип и фиброгенные свойства макрофагов человека. Впервые показано, что М-CSF-дифференцированные макрофаги в ответ на LPS/IFN $\gamma$  отличаются более низким уровнем экспрессии CD86 и продукции провоспалительных цитокинов, IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-17, TNF $\alpha$  по сравнению с GM-CSF-дифференцированными аналогами. Противовоспалительные поляризующие стимулы (IL-4, дексаметазон, эффероцитоз) «настраивают» макрофаги на высокий уровень экспрессии M2-ассоциированных маркеров (CD163, MerTK) и более низкий уровень продукции IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IFN $\gamma$  вне зависимости от условий дифференцировки (М-CSF/GM-CSF). Впервые показано, что M2 макрофаги независимо от дифференцировочного и поляризующего стимула отличаются от функционально противоположного M1 фенотипа более низкой способностью стимулировать пролиферативный ответ аллогенных Т-лимфоцитов. Впервые показано, что М-CSF-дифференцированные макрофаги, независимо от дальнейшей поляризации, характеризуются высоким уровнем продукции матриксной металлопротеиназы 9 (MMP-9), крайне низким уровнем ингибитора TIMP-1 и высоким соотношением MMP-9/TIMP-1. Напротив, 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. 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- $\beta$ 1, фактора роста эндотелия сосудов и ангиогенина. Впервые показана способность различных фенотипов GM-CSF-дифференцированных макрофагов регулировать пролиферативный ответ фибробластов кожи посредством растворимых факторов, максимальный уровень стимуляции отмечен в присутствии M2c(Dex). Установлен стимулирующий эффект растворимых факторов макрофагов на дифференцировку фибробластов, в частности, экспрессию  $\alpha$ -гладкомышечного актина и продукцию коллагена I типа, с наиболее выраженным эффектом в случае M2(LS). Все эти новые сведения проясняют представления о закономерностях влияния макрофагов на фиброгенез и служат основой для разработки метода идентификации макрофагов 1 и 2 типа.

### **Теоретическая и практическая значимость**

Полученные результаты имеют несомненную фундаментальную значимость, поскольку расширяют представления о пластичности макрофагов человека, в частности, изменении их функционального фенотипа в зависимости от дифференцировочного (M-CSF или GM-CSF) и поляризирующего стимулов (LPS, IFN $\gamma$ , IL-4, дексаметазон, эффероцитоз), а также дают представление о регуляторном влиянии макрофагов человека на фиброгенез. В работе Максимовой А.А. изучен вклад дифференцировочных и поляризирующих сигналов в модуляцию про-, либо антифиброгенных свойств макрофагов и исследовано влияние различных функциональных фенотипов

макрофагов на фибробласты, что может служить основой для разработки новых подходов, терапии патологических состояний, обусловленных дисрегуляцией фиброгенеза. Автор выявила уникальный фенотип макрофагов – M2(LS) с высоким профиброгенным потенциалом, который опосредуется продукцией TGF- $\beta$ 1, TIMP-1 и коллагена I, а также стимулирующим влиянием на дифференцировку фибробластов.

Значение работы в прикладном аспекте заключается в предложении нового метода идентификации M1/M2 подтипов макрофагов, основанном на универсальном интегральном показателе этих клеток – аллостимуляторной активности. Анализ операционных характеристик данного теста показал его высокую чувствительность и специфичность в отношении идентификации M1/M2 подтипов M-CSF и GM-CSF-дифференцированных макрофагов. Новизна и практическое значение данного метода подтверждается получением патента РФ 2717024 «Способ идентификации функционального M1 и M2 фенотипа макрофагов человека, генерированных *in vitro* из моноцитов крови».

### **Общая характеристика диссертационной работы**

Диссертационная работа Максимовой А.А. написана в традиционном стиле, состоит из введения, литературного обзора (Глава 1), описания материалов и методов (Глава 2), результатов собственных исследований (Глава 3), обсуждения результатов (Глава 4), заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 121 странице машинописного текста, хорошо иллюстрирована 23 рисунками и 3 таблицами. Прилагаемый библиографический список содержит ссылки на 210 литературных источников, в том числе 207 иностранных.

Цель работы сформулирована корректно и заключается в характеристике функциональных фенотипов и фиброгенной активности макрофагов человека, генерируемых *in vitro* под действием различных дифференцировочных и поляризующих сигналов. Определены 4 объемные задачи, соответствующие цели.



Во введении автор обосновывает выбор темы, приводит аргументы, указывающие на актуальность и необходимость данного исследования.

Литературный обзор содержит два раздела, в которых автор подробно излагает полученные в мире сведения о методах поляризации макрофагов и их функциональном статусе и дает представление о роли макрофагов в фиброгенезе, описывает возможные механизмы их фибромодулирующих эффектов. В обзоре подробно описаны различные подтипы макрофагов, представлены три таблицы, иллюстрирующие их свойства. Во втором разделе изложены основные закономерности реализации фибротического процесса и существующие данные по регуляторному влиянию макрофагов на процесс синтеза/деградации внеклеточного матрикса. Приведенные данные свидетельствуют о целесообразности решения задач, поставленных в диссертации.

Глава 2 «Материалы и методы» содержит сведения о методических подходах, использованных в исследовании. В работе используется широкий спектр современных иммунологических методов, включая проточную цитометрию, иммуноферментный и мультиплексный протеомный анализ. Полученные данные проанализированы с использованием адекватных методов статистического анализа.

Собственные результаты представлены в Главе 3, которая состоит из двух больших разделов. Первый раздел включает подробную характеристику функциональных фенотипов макрофагов (анализ морфологии, экспрессия поверхностных маркеров, цитокин- и хемокин-секреторная и аллостимуляторная активность). По каждому параметру сравниваются макрофаги, дифференцированные в разных условиях (M-CSF vs GM-CSF) и поляризованные различными стимулами (липополисахарид, IL-4, дексаметазон, эффероцитоз). Получены новые данные о свойствах макрофагов в модельных системах различных режимов поляризации и дифференцировки. Суть результатов проанализирована в отзыве на стр. 2 и 3.

Второй раздел посвящен исследованию фиброгенных свойств макрофагов и включает результаты исследования прямых и опосредованных эффектов макрофагов на процесс синтеза/деградации внеклеточного матрикса. Автором проведен большой объем исследований, что позволило проанализировать участие патогенетически значимых факторов – продукции коллагена, протеаз ВКМ и тканевых ингибиторов металлопротеиназ, фиброгенных ростовых факторов, а также оценить влияние макрофагов на пролиферативную активность, дифференцировку и коллаген-продуцирующую активность фибробластов. Полученные данные легли в основу двух положений, выносимых на защиту.

В главе «Обсуждение» автор дает интерпретацию полученных результатов, проводит обсуждение фактов с анализом итогов научной работы в сопоставлении с данными литературы. Несомненно, результаты диссертационной работы можно оценить как существенное дополнение к имеющимся представлениям в этой области.

Итоги работы подведены в «Заключении». Оно содержит краткое изложение основных результатов с учетом литературных сведений.

Сформулированы 5 выводов, которые соответствуют поставленным задачам и полностью отражают полученные данные.

Принципиальных замечаний по работе нет. Диссертация и автореферат написаны грамотным литературным языком, практически не встречается ошибок, за исключением нескольких пунктуационных.

Вопросы: Работа носит экспериментальный характер, не могли бы Вы пояснить, по какому принципу выбраны клеточные линии фибробластов?

2. Поясните подробно, какую практическую значимость результатов вы видите на данном этапе?

3. Предложенный Вами метод идентификации M1 и M2 может ли служить инструментом для экспресс предсказания поведения макрофагов в плане реализации провоспалительной и противовоспалительной функции?



## **Достоверность полученных результатов и степень обоснованности научных положений**

Высокая достоверность полученных результатов определяется продуманным дизайном исследования, подтверждается использованием современных методических подходов с автоматизированной оценкой результатов, а также адекватными методами статистической обработки данных. Полученные данные всесторонне проанализированы в свете последних научных достижений по теме исследования, что позволило автору с высокой степенью обоснованности сформулировать основные положения и выводы диссертации.

Автореферат и опубликованные работы отражают основные положения и выводы диссертации. По теме диссертации опубликовано 7 печатных работ, из них 5 статей в журналах, рекомендованных ВАК РФ для публикации материалов диссертационных работ, индексируемых в базах Web of Science, Scopus и РИНЦ. Результаты работы обсуждены на российских и международных конференциях.

## **Заключение**

Диссертационная работа Максимовой А.А. «Характеристика функциональных фенотипов и фиброгенной активности макрофагов человека *in vitro*», представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, является самостоятельной законченной научной квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной для иммунологии научной задачи – изучены механизмы влияния макрофагов на процессы фиброгенеза и предложен новый метод идентификации M1 и M2 фенотипов как инструмент оценки активности макрофагов.

По актуальности, научной новизне, теоретической и научно-практической значимости полученных результатов, диссертационная работа 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), а ее автор Максимова А.А. заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология.

Отзыв заслушан и утвержден на заседании межлабораторного семинара экспериментального отдела НИИ онкологии федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук» «02» ноября 2021 года, протокол № 9.

Утвержденный отзыв будет направлен в диссертационный совет в соответствии с требованием Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842 (в редакции от 01.10.2018 с изм. от 11.09.21 г).

Заместитель директора по научной  
работе НИИ онкологии Томского НИМЦ,  
Заведующий лаборатории молекулярной  
онкологии и иммунологии  
НИИ онкологии Томского НИМЦ  
доктор биологических наук,  
профессор, член-корреспондент РАН



Чердынцева Н.В.

Подпись доктора биологических наук, профессора, член.-кор. РАН  
Чердынцевой Н.В. «ЗАВЕРЯЮ»:

Ученый секретарь Томского НИМЦ  
к.б.н.



И.Ю.Хитринская

08.11.2021

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук» Адрес: Россия, 634009, г.Томск, пер. Кооперативный, 5  
Тел.: +7(3822)51-10-39, факс: (3822)28-26-76  
E-mail: onco@tnimc.ru  
Сайт: <http://www.tnimc.ru>