

УТВЕРЖДАЮ:

Врио директора федерального  
государственного бюджетного  
научного учреждения «Томский  
национальный исследовательский  
медицинский центр Российской  
академии наук»



В.И. Лебедько

«12» мая 2025 г.

### **ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ**

**федерального государственного бюджетного научного учреждения  
«Томский национальный исследовательский медицинский центр  
Российской академии наук» на диссертационную работу Ращупкина  
Ивана Михайловича «Нейрорегуляторные и противовоспалительные  
эффекты секреторных продуктов M2 макрофагов *in vitro* и *in vivo*»,  
представленную на соискание учёной степени кандидата медицинских  
наук по специальности 3.2.7. Иммунология**

#### **Актуальность темы диссертационной работы**

Макрофаги являются гетерогенной популяцией клеток и обладают выраженной пластичностью, которая проявляется в способности изменять свой функциональный фенотип в зависимости от сигналов микроокружения. При этом макрофаги с провоспалительной активностью проявляют преимущественно тканедеструктивные свойства, тогда как макрофаги с противовоспалительной активностью опосредуют регенеративные эффекты. Показана способность моноцитов мигрировать в ткани головного мозга и дифференцироваться в макрофаги. Отмечена сопряженность функционального восстановления при нейропатологии с активацией и определенной направленностью поляризации макрофагов. Это дает основания предполагать возможность контроля со стороны макрофагов в ЦНС, как и в других тканях. Тем не менее, нейрорегенераторные эффекты

различно активированных макрофагов человека, так же, как и возможность использования секреторных продуктов макрофагов в лечении психоневрологических заболеваний, остаются практически неисследованными. Большой интерес в этом плане представляет изучение свойств макрофагов, поляризованных в M2-фенотип посредством эффероцитоза - взаимодействия макрофагов с апоптотическими клетками, для запуска регенераторного процесса. В связи с неуклонным ростом тревожно-депрессивных расстройств существенное внимание среди различных моделей нейропатологии привлекает модель депрессивно-подобного поведения, патогенез которой связан с нейровоспалением и угнетением нейрогенеза. В качестве инструмента использовали клеточную линию нейробластомы SH-SY5Y как модель нейродегенеративных заболеваний с возможностью конвертации клеток в различные типы функциональных нейронов под влиянием специфических медиаторов. Работа Ращупкина И.М. посвящена сравнительному исследованию *in vitro* эффектов секреторных продуктов различно активированных (в том числе эффероцитозом) макрофагов на свойства нейральных предшественников линии SH-SY5Y и изучению противовоспалительного и регенеративного эффекта секрета макрофагов, поляризованных контактом с апоптотическими клетками, в модели стресс-индуцированной депрессии у мышей.

### **Соответствие темы диссертации научной специальности**

Диссертация Ращупкина И.М. выполнена на базе лаборатории клеточной иммунотерапии и нейроиммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии». Объектом исследования являются иммунные клетки, в частности, генерируемые из моноцитов макрофаги человека, и их секреторные продукты. При этом задачи исследований *in vitro* нацелены на сравнительное изучение регуляторных эффектов секреторных продуктов различно активированных (в том числе эффероцитозом) макрофагов на



функции НСК-подобных нейральных предшественников, включая выживаемость, пролиферацию и дифференцировку клеток в условиях, моделирующих повреждение. В свою очередь фрагмент исследований *in vivo* посвящен анализу эффектов секреторного продукта макрофагов с наибольшей регенеративной активностью (в данной работе секреторных продуктов макрофагов, активированных контактом с апоптотическими клетками) в модели стресс-индуцированной депрессии, патогенез которой связан с нейровоспалением и подавлением нейрогенеза. В этой части работы оценивается влияние интраназального введения секреторных продуктов макрофагов на воспаление (концентрацию провоспалительных цитокинов в лизатах отдельных структур головного мозга и экспрессию активационного маркера макрофагов/клеток микроглии – Iba-1) и плотность нейронов, а также поведенческий паттерн. Таким образом, тема диссертационной работы полностью соответствует специальности 3.2.7. Иммунология (медицинские науки), согласно паспорта специальности: пункту №4 «Исследование роли иммунных механизмов в различных физиологических процессах (регенерации, репродукции, старении, нейроэндокринных взаимодействиях, взаимодействии с микробиомом и др.», пункту №6 «Разработка и усовершенствование методов диагностики, лечения и профилактики инфекционных, аллергических и других иммунопатологических процессов».

### **Научная новизна исследования**

В данной работе впервые показано, что растворимые факторы GM-CSF-дифференцированных макрофагов человека, поляризованных IFN $\gamma$  [M1(IFN- $\gamma$ )], IL-4 [M2a(IL-4)] и через механизм эффероцитоза [M2(LS)], стимулируют пролиферацию и дифференцировку нейральных клеток SH-SY5Y в условиях депривации ростовых/сывороточных факторов и комбинированного воздействия депривации с CoCl $_2$ -индуцированной гипоксией. При этом наиболее выраженное стимулирующее влияние в условиях длительного комбинированного повреждения оказывают M2(LS)

макрофаги. Кроме того, показано, что в условиях комбинированного повреждения способность усиливать выживаемость нейральных клеток SH-SY5Y свойственна исключительно растворимым факторам M2(LS) макрофагов. Впервые продемонстрировано, что курсовое интраназальное введение секреторных факторов M2(LS) макрофагов мышам в модели стресс-индуцированной депрессии приводит к значимой коррекции поведенческого паттерна мышей, снижению уровня провоспалительных цитокинов и маркера активации макрофагов/микроглии IBA-1 в патогенетически значимых зонах головного мозга, а также повышению нейрональной плотности. В целом, полученные данные свидетельствуют о высокой нейрорегуляторной и иммуномодулирующей активности макрофагов человека с M2 фенотипом, поляризованных через механизм эффероцитоза.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Теоретическая значимость работы заключается в расширении знаний о нейрорегенераторном потенциале различных функциональных фенотипов макрофагов человека на основе сравнительного анализа влияния макрофагов, генерированных из моноцитов крови в присутствии GM-CSF и поляризованных IFN $\gamma$ , IL-4 и через механизм эффероцитоза, на жизнеспособность, пролиферативную активность и дифференцировку нейральных предшественников линии SH-SY5Y в условиях депривации сыворотки и гипоксии *in vitro*. Впервые показан выраженный нейропротективный и нейрорегенераторный эффект секреторного продукта M2(LS) макрофагов в условиях повреждения клеток SH-SY5Y. Требованиям научной новизны отвечают исследования, проведенные *in vivo* в модели стресс-индуцированной депрессии у мышей, которые показали антидепрессивный эффект интраназального введения секреторного продукта M2(LS), сопряженный со снижением выраженности воспаления и повышением нейрональной плотности в патогенетически значимых зонах головного мозга. Практическая значимость работы заключается в выявлении



фенотипа макрофагов с высокой нейрорегуляторной и противовоспалительной активностью, которые в дальнейшем могут быть рассмотрены в качестве клеточно-молекулярной платформы для терапии нейровоспалительных и нейродегенеративных заболеваний.

### **Достоверность полученных результатов диссертационной работы и обоснованность научных положений и выводов**

Диссертационная работа Ращупкина И.М. представляет собой завершённое исследование, выполненное на высоком научном и методическом уровне. Достоверность полученных результатов базируется на достаточном объеме проведенных *in vivo* и *in vitro* экспериментальных исследований. Цель и задачи работы, сформулированные автором, выполнены в полном объёме. Достоверность полученных результатов обеспечивается продуманным дизайном исследования, использованием современных высокоинформативных иммунологических методов исследования. Результаты работы получены на сертифицированном и откалиброванном оборудовании. Полученные автором экспериментальные данные обработаны с применением адекватных статистических методов и достоверны. Положения, выносимые на защиту, в полной мере подтверждены полученными результатами. Выводы основываются на полученных результатах исследования.

### **Структура и общая характеристика диссертационной работы**

Диссертационная работа Ращупкина И.М. имеет классическую структуру и состоит из введения, литературного обзора (глава 1), описания материалов и методов исследования (глава 2), результатов собственных исследований (глава 3), их обсуждения (глава 4), заключения, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 272 источника. Текст изложен на 142 страницах, включает 18 рисунков и 5 таблиц.

Цель работы сформулирована корректно и заключается в оценке эффектов секреторных факторов различно активированных макрофагов человека на функции нейральных предшественников в условиях повреждающих воздействий *in vitro* и изучении влияния наиболее эффективного секреторного продукта в модели стресс-индуцированной депрессии *in vivo*. Определены 5 задач исследования, соответствующих поставленной цели.

Во введении автор работы обосновывает выбор темы исследования и её актуальность, формулирует положения, выносимые на защиту, аргументирует научную новизну, теоретическую и практическую значимость работы.

В литературном обзоре подробно описана фенотипическая гетерогенность макрофагов человека, охарактеризованы известные фенотипы. Приведены данные о роли макрофагов и микроглии в функционировании ЦНС и, в частности, участие их в процессах нейрорегенерации. Представлена информация о различных подходах к изучению процессов нейрорегенерации как *in vitro*, так и *in vivo*. Автором достаточно подробно рассмотрены основные гипотезы формирования депрессивного расстройства. Описан иммунопатогенез нейропатологических состояний и, в частности, место в нём макрофагов. Рассмотрены подходы к терапии различных заболеваний ЦНС с использованием макрофагов и факторов, продуцируемых ими.

Глава 2 (Материалы и методы), содержит сведения о методических подходах, применяемых в исследовании. В работе использован достаточно широкий спектр современных высокотехнологичных иммунологических методов, включая проточную цитофлюорометрию, иммуноферментный анализ, иммуногистохимический метод. Подробно охарактеризованы схемы экспериментов *in vitro* и *in vivo*, описана модель стресс-индуцированной депрессии.



Полученные в работе результаты представлены в главе 3, которая включает 5 разделов, логически выстроенных в соответствии с поставленными задачами. Первые три раздела посвящены изучению влияния секреторных продуктов M1, M2a и M2(LS) макрофагов на свойства нейральных клеток SH-SY5Y, а именно пролиферативную активность, жизнеспособность и дифференцировку, в условиях воздействия повреждающих факторов - депривации сыворотки и гипоксии. Четвертый и пятый разделы работы посвящены исследованию эффектов интраназального введения секреторного продукта M2(LS) макрофагов, показавших наиболее выраженную нейропротективную и нейрорегуляторную активность *in vitro*, в модели стресс-индуцированной депрессии у мышей *in vivo*. Последовательно охарактеризовано влияние M2(LS) на поведенческий паттерн мышей, выраженность воспаления и нейрональную плотность в патогенетически значимых зонах головного мозга. Полученные данные легли в основу двух положений, выносимых на защиту.

В главе «Обсуждение» автор описывает полученные результаты, сопоставляет их с данными мировой литературы, что позволяет сформировать достаточно полное представление о проделанной работе.

В разделе «Заключение» подводится краткий итог работы. Выводы диссертации полностью соответствуют полученным результатам.

Материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на научных конференциях и форумах и представлены в 7 печатных работах, включая 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ для публикации результатов кандидатских и докторских диссертаций. Автореферат полностью отражает содержание диссертационной работы.

### **Замечания и вопросы**

Диссертация написана грамотным литературным языком. Имеющиеся немногочисленные опечатки не сказываются на общей положительной оценке диссертации.

Вопросы: В первом положении указано, что под влиянием факторов активированных макрофагов одновременно происходит стимуляция пролиферации и дифференцировки нейтральных клеток. Какова роль эффероцитоза в указанных процессах.

В качестве замечаний следует отметить не совсем корректное употребление понятия «депривация», ведь речь идет о депривации сыворотки, и следует всегда употреблять это сочетание терминов.

### **Заключение**

Диссертационная работа Ращупкина Ивана Михайловича «Нейрорегуляторные и противовоспалительные эффекты секреторных продуктов M2 макрофагов *in vitro* и *in vivo*», представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.2.7. Иммунология, является самостоятельной завершенной научно-квалификационной работой, выполненной на высоком методическом уровне и посвященной решению актуальной для современной иммунологии научной задачи – характеристике регуляторных эффектов секреторных продуктов M2 макрофагов *in vitro* и *in vivo*.

Таким образом, по своей актуальности, научной новизне, теоретической и научно-практической значимости полученных результатов, диссертационная работа полностью соответствует требованиям ВАК РФ, предъявляемым к кандидатским диссертациям (п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842, с изменениями от 25.01.2024 г., № 62), а её автор Ращупкин И.М. заслуживает присуждения искомой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.2.7. Иммунология.

Отзыв на диссертационную работу Ращупкина Ивана Михайловича подготовлен член-корреспондентом РАН, профессором, доктором биологических наук, заслуженным деятелем науки РФ Чердынцевой



Надеждой Викторовной, обсужден и утвержден на заседании межлабораторного семинара НИИ онкологии Томского НИМЦ (протокол №10 от «12» мая 2025 г.)

Врио заместителя директора по научной работе,  
руководитель научного направления,  
заведующий лабораторией молекулярной онкологии и иммунологии  
научно-исследовательского института онкологии – филиала Федерального  
государственного бюджетного научного учреждения «Томский  
национальный исследовательский медицинский центр Российской академии  
наук»,  
доктор биологических наук, профессор  
член-корреспондент РАН

Н.В. Чердынцева

Подпись доктора биологических наук, профессора, член-корреспондента РАН  
Чердынцевой Н.В.

«ЗАВЕРЯЮ»:

Врио директора  
федерального государственного бюджетного научного учреждения  
«Томский национальный исследовательский  
медицинский центр Российской академии наук



В.И.Лебедько

«12» мая 2025 г.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук».  
Адрес: 634050, г. Томск, ул. Набережная реки Ушайки, д. 10  
Телефон: 8(3822) 51-22-28  
адрес электронной почты: center@tnimc.ru  
сайт: <https://www.tnimc.ru>