

Отзыв

официального оппонента, доктора медицинских наук, профессора

Савченко Андрея Анатольевича,

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. Актуальность работы Максимовой Александры Александровны обусловлена слабой изученностью свойств макрофагов человека в отношении регуляции фибротических процессов. В экспериментальных работах продемонстрирована ключевая роль данных клеток в регуляции всех стадий репаративного заживления и фиброза. Однако поскольку макрофаги человека во многом отличаются от макрофагов мыши по сигнальным путям активации, экспрессии поверхностных маркеров, спектру продуцируемых цитокинов и других факторов, остается неизвестным, насколько результаты, полученные у экспериментальных животных, могут быть экстраполированы на макрофаги человека. Существующие в настоящий момент данные в большинстве своем ограничены характеристикой двух оппозитных популяций макрофагов (M1 и M2a), в то время как свойства других функциональных фенотипов изучены недостаточно. Соответственно, тема диссертации расширяет имеющиеся представления о различных функциональных фенотипах макрофагов человека, а также об участии макрофагов с различными фенотипами в регуляции фибротических процессов. Подобные исследования открывают новые возможности для разработки медицинских технологий лечения патологий, связанных с нарушением фиброгенеза.

Структура и оформление диссертации. Работа написана в традиционном стиле, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов, обсуждения, заключения и выводов. Диссертация изложена на 121 странице, библиографический указатель включает 210 источников, из них 207 зарубежных. В работе представлены 3 таблицы и 23 рисунка.

Во «Введении» охарактеризована актуальность исследования, обозначены проблемы, поставлены цель и задачи.

Литературный обзор содержит два больших раздела, в которых автор подробно излагает известные, в настоящий момент, данные по поляризации макрофагов и концепцию фиброгенеза, а также современное представление о роли макрофагов в фиброгенезе. В обзоре подробно описаны различные подтипы макрофагов, представлены три таблицы, иллюстрирующие их свойства.

Глава «Материалы и методы» подробно описывает подходы, примененные 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 описаны в 3-ей главе, состоящей 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 (LPS, IL-4, дексаметазон, эффероцитоз). Второй раздел посвящен исследованию фиброгенных свойств макрофагов и включает исследование прямых и опосредованных эффектов на процесс синтеза/деградации внеклеточного матрикса. Автором проведен большой объем исследований, что позволило проанализировать ряд параметров – продукцию коллагена, протеаз ВКМ и тканевых ингибиторов металлопротеиназ, фиброгенных ростовых факторов, а также влияние макрофагов на пролиферативную активность, дифференцировку и коллаген-продуцирующую активность фибробластов.

В разделе «Обсуждение» автор подвергает полученные результаты полноценному осмыслению и обсуждению с анализом итогов научной работы в сопоставлении с данными литературы.

Итоги работы подведены в «Заключении» и «Выводах». Выводы соответствуют задачам диссертационного исследования и основаны на полученных результатах.

Научная новизна, теоретическая и практическая значимость. В работе исследованы функциональные фенотипы макрофагов человека и механизмы их фиброгенной активности. Автором продемонстрирован ряд

новых данных, касающихся изменения свойств в ответ на дифференцировочные и поляризующие сигналы, продукции макрофагами человека протеаз внеклеточного матрикса и коллагена, а также влияние на функциональную активность фибробластов. Исследование расширяет знания о пластичности макрофагов человека, в частности, изменении их функционального фенотипа в зависимости от дифференцировочного (M-CSF или GM-CSF) и поляризующего стимулов (LPS, IFN γ , IL-4, дексаметазон, эффероцитоз). Полученные результаты раскрывают степень вовлеченности дифференцировочных и поляризующих сигналов в модуляцию про-/антифиброгенных свойств макрофагов и существенно дополняют данные о регуляторном влиянии различных функциональных фенотипов макрофагов на фиброгенез. Кроме того, охарактеризован уникальный фенотип макрофагов, поляризованных в M2 направлении в результате эффероцитоза, и установлен их профиброгенный потенциал, обусловленный продукцией TGF- β 1, TIMP-1, коллагена I, а также стимулирующим влиянием на дифференцировку фибробластов. 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 (патент РФ № 2717024).

По материалам диссертации опубликовано 7 печатных работ, из них 5 оригинальных статей в журналах, индексируемых в WoS, Scopus и РИНЦ.

Достоверность и обоснованность полученных результатов и выводов. Достоверность и обоснованность данных, полученных в диссертационном исследовании, обеспечивается подробным описанием методов исследования, продуманным дизайном работы, а также приведением статистических методов, использованных для обработки данных. Эксперименты проведены в соответствии с целью и задачами исследования. Выводы диссертации основаны на полученных результатах.

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).

Принципиальных замечаний к работе не имею, однако в порядке дискуссии хотел бы высказать некоторые пожелания, а также задать ряд вопросов:

1. В разделе 2.1. (Генерация макрофагов) представлено «... Мф получали при помощи механической диссоциации...». Какой процент жизнеспособных клеток получали? Формировались ли при этом клеточные агрегаты? Почему не использовали раствор Версена?
2. В разделе 3.1.2. (Фенотипическая характеристика макрофагов) сказано «Поскольку наиболее общепринятым, хотя и не лишенным недостатков подходом к характеристике Мф является определение поверхностных и внутриклеточных маркеров,...». Какие недостатки Вы видите при определении поверхностных и внутриклеточных маркеров макрофагов? Каким образом их можно нивелировать?
3. В этом же разделе (3.1.2) отмечено «Одним из характерных признаков M1(LPS) является экспрессия CD86, однако в культурах M-CSF-дифференцированных Мф при стимуляции LPS доля CD86+ клеток не превышала 10%...». При этом, в культуре GM-CSF-дифференцированных M1 макрофагов количество клеток, экспрессирующих CD86 составляло «25 до 60%». К какой субпопуляции макрофагов относились клетки, неэкспрессирующие CD86? Какие клеточные показатели были главными для определения принадлежности макрофагов к соответствующей субпопуляции?
4. В разделе 3.1.4. (Аллостимуляторная активность макрофагов) показаны результаты ROC-анализа. Считаю, что общее описание метода должно быть представлено в разделе 2.7. (Статистическая обработка результатов).
5. Установлена широкая вариация «антифиброгенного» индекса (раздел 3.2.3. Прямое влияние GM-CSF-дифференцированных Мф на ВКМ) для GM-CSF-дифференцированных Мф. Чем можно объяснить данный результат?

Заключение. Диссертационная работа 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 содержится решение научной задачи – определение свойств и фиброгенной активности

макрофагов человека под влиянием различных сигналов микроокружения, имеющей значение для иммунологии и клеточной биологии.

По актуальности темы, новизне и значимости полученных результатов, обоснованности научных выводов диссертационная работа Максимовой А.А. соответствует требованиям ВАК РФ к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук в п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней» (утверждено постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 № 812). Автор Максимова Александра Александровна достойна присуждения ей ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.09 – Клиническая иммунология, аллергология.

Официальный оппонент:

доктор медицинский наук, профессор,

руководитель лаборатории клеточно-молекулярной

физиологии и патологии НИИ медицинских проблем Севера

ФИЦ КНЦ СО РАН

Савченко Андрей Анатольевич

17.11.2021

Савченко Андрей Анатольевич, доктор медицинских наук (14.03.03 – патологическая физиология), профессор (по специальности «Патологическая физиология»), руководитель лаборатории клеточно-молекулярной физиологии и патологии федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук» (ФИЦ КНЦ СО РАН), обособленного подразделения «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера», 660022, Красноярский край, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, д. 3Г, тел. +7 (391) 228-06-62, web-сайт <http://www.impn.ru>, e-mail: clinic@impn.ru.

Контактные данные автора отзыва: тел. +7 (391) 228-06-63, +7 (905) 971-37-15; e-mail: immun@impn.ru, aasavchenko@yandex.ru.



ПОДПИСЬ
О.И. Сусарева