

Отзыв официального оппонента

кандидата биологических наук, ведущего научного сотрудника лаборатории клинической и геномной биоинформатики федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) Сунцовой Марии Владимировны на докторскую работу Карпенко Дмитрия Владимировича «Иммунная регуляция мезенхимных стволовых клеток и их потомков в очагах эктопического кроветворения», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 3.1.28. Гематология и переливание крови и 1.5.3. Молекулярная биология.

Актуальность темы диссертации

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) играют важную роль в формировании кроветворных ниш и составляют часть стромы костного мозга. Но также они присутствуют во всех тканях организма. МСК получили широкое распространение в исследованиях благодаря способности к дифференцировке и иммуномодулирующим свойствам. Спектр областей для потенциального практического применения МСК включает регенеративную медицину, трансплантологию, контроль аутоиммунных заболеваний и даже онкологию. Для научных и практических целей как правило их выделяют из жировой ткани, костного мозга, кожи.

В настоящее время активно исследуется тема иммунных привилегий клеток, в первую очередь в контексте опухолевых стволовых клеток. При этом вопрос иммунных привилегий непатологических стволовых клеток изучается намного менее активно. И явление иммунных привилегий стволовых клеток было показано лишь для небольшого числа тканей. В свою очередь, по результатам ранних исследований, для МСК не было показано выраженных иммунных привилегий. И данная работа вызывает интерес, так как показанные в ней результаты о наличии иммунных привилегий идут вразрез с ранними работами.

Научная новизна докторской работы

В основе исследования иммунных привилегий лежит оригинальный подход. Для этого была разработана модель очагов эктопического кроветворения с использованием трансплантатов костного мозга от трансгенных животных. В работе использовалась линия мышей, чьи мезенхимные стволовые клетки экспрессируют GFP под промотором нестина, но не их дифференцированные потомки. При введении нетрансгенному реципиенту трансгенных трансплантатов костного мозга они восстанавливают кроветворную территорию под надзором полноценной иммунной системы.

Дмитрий Владимирович показал наличие иммунных привилегий у мезенхимных стволовых клеток *in vivo*, чего не удавалось показать ранее. Сильные иммунные привилегии мезенхимных стволовых клеток оказались достаточны даже для выживания клеток в иммунизированном против GFP реципиенте. Показано, что мезенхимные стволовые клетки не только выживают, но и сохраняют функциональность для формирования вторичных очагов при ретрансплантации. В работе показано, что иммунизация приводит к формированию очагов эктопического кроветворения большего размера. Карпенко Д.В. была выдвинута гипотеза о существования общей эпигенетической регуляции, приводящей к формированию очагов увеличенного размера, как при воспалении, так и при иммунизации и облучении.

Для оценки вклада эпигенетической регуляции в образование очагов кроветворения был проведен анализ метилирования промотора гена *P1b* в различных тканях с помощью бисульфитной конверсии. В ходе этого Дмитрием Владимировичем был разработан новый подход для определения доли метилированных СрG-динуклеотидов в образце по электрофоретическим профилям секвенирования по Сэнгеру.

В ходе исследования было показано тканеспецифичное метилирование промотора *P1b*, что согласуется с характером его экспрессии. При этом облучение не оказalo эффекта на метилирование и активность промотора *P1b* в исследуемых тканях.

Основываясь на результатах работы и литературных данных, Дмитрий Владимирович вводит термин «стволовая система». Согласно предложенному определению, стволовая система включает стволовые клетки, их потомков, иммунные клетки и всё разнообразие сигналов, регулирующих стволовую нишу. Стволовая система отвечает на регенеративный запрос, поддерживает количество и разнообразие дифференцированных клеток и выполняет иммунную регуляцию.

Достоверность исследования, полученных результатов и выводов сформулированных в диссертации

Достоверность результатов обеспечивается подробным описанием материалов и методов работы. Работа выполнена на объёме материала достаточного для формулирования статистически обоснованных выводов. Материалы представлялись на российских и международных конференциях. Материалы диссертационной работы опубликованы в рецензируемых научных изданиях, включая журналы первого и второго квадриля, что обосновывает достоверность и актуальность представленных результатов.

Значимость для науки и практики полученных автором результатов

Экспериментальное подтверждения иммунных привилегий МСК костного мозга *in vivo* имеет как фундаментальное, так и практическое значение. Углубление знаний о взаимосвязи стволовых и иммунных процессов является критически важным для понимания патогенеза и разработка стратегий лечения широкого спектра заболеваний, включающих аутоиммунные и опухолевые. Потенциал контроля над «включением» и «выключением» иммунных привилегий клеток, как нормальных, так и патологических, откроет большие возможности для трансплантологии, регенеративной медицины, онкологии и ревматологии.

Разработанный автором быстрый и дешевый метод изучения метилирования СрG-динуклеотидов ценен как альтернатива более дорогостоящим и трудозатратным методам на основе NGS.

Оценка содержания и результатов работы

Диссертационная работа Карпенко Дмитрия Владимировича построена по стандартному плану и состоит из введения, обзора литературы, изложения материалов и методов исследований, результатов и обсуждения, выводов, списка литературы и списка основных сокращений. Работа изложена на 177 машинописных листах, содержит 7 таблиц и 40 рисунков. Список литературы содержит ссылки на 331 источник.

Во введении автор представляет актуальность проблемы, а также чётко обосновывает цель и задачи диссертационной работы, научную новизну и практическую значимость работы, достоверность полученных результатов. Обзор литературы описывает историю,

терминологию и известные методы исследований. Материалы и методы исследования подробно изложены в соответствующей главе.

Результаты исследований начинаются с описания разработки и оптимизации подхода для изучения иммунной регуляции иммунологически меченных клеток в очагах эктопического кроветворения. Далее представлены данные демонстрирующие иммунные привилегии МСК. Результаты иммунизации показывают специфическую активацию иммунной системы в ответ на иммунизацию против GFP. Данные на иммунизированных животных демонстрируют силу иммунных привилегий Nes-GFP⁺ клеток, в том числе и МСК, а также сохранение функциональной активности МСК при ретрансплантациях. Отмечается, что в иммунизированных мышах очаги вырастают увеличенного размера. Увеличение размеров очагов связывается с действием *P1b*.

Далее представлены результаты исследования эпигенетической регуляции *P1b*. Материал начинается с описания предложенного метода для исследования 5mC в ДНК. Анализ на основе предложенного метода не показал изменений в ответ на облучение, однако Дмитрию Владимировичу удалось показать дифференциальное метилирование промотора *P1b* в различных тканях и частичную связь с экспрессией гена.

Обсуждение посвящено обобщению полученных и литературных данных. На основе синтеза информации автор рассуждает о причинах, лежащих в основе продемонстрированных иммунных привилегий стволовых клеток. В завершение работы автор выдвигает гипотезу о связи иммунных привилегий с покоящимся состоянием стволовых клеток, а также о связи нестина с наличием иммунных привилегий.

Вопросы и замечания

Критических замечаний к оформлению и содержанию диссертации и автореферата не имеется. Тем не менее есть несколько некритичных замечаний, а также пара вопросов.

1. Несколько смущает структура главы, посвященной методам исследования эпигенетической регуляции. В начале описаны методы, такие как секвенирование по Сэнгеру, флуоресцентной гибридизация *in situ*, методы изучения РНК, но там практически не поясняется, каким образом они применимы конкретно к анализу эпигенетической регуляции. Далее метод Illumina TruSeq Methyl Capture EPIC вынесен в отдельный раздел, хотя он является частным случаем бисульфитного секвенирования, а вместо описания метода приводится описание принципа секвенирования на платформе Illumina. На мой взгляд логичнее было бы начать с определения уровней, на которых происходит эпигенетическая регуляция: модификация геномной ДНК, связанные с ДНК белки, некодирующие РНК. И затем для каждого уровня перечислять методы исследования, при этом уделяя основное внимание не базовым описаниям принципа метода, как, например, клонирование ДНК или секвенирование на Nanopore, а конкретным особенностям подхода, позволяющим детектировать определенные модификации ДНК или белков, отдельные типы РНК и т.д..

2. Нет расшифровки сокращения «sRNA». Видимо речь идет о small RNA

3. Предлагается использовать термин «стволовая система». Какой представляется организация этой единой системы в тканях и органах нашего организма имеющих в ряде случаев весьма выраженные различия?

4. Проводилась ли трансплантация после облучения для воспроизведения литературных данных? Аналогично, были ли попытки оценить влияние *P1b* на рост очагов кроветворения?

Заключение

Диссертация Карпенко Дмитрия Владимировича на тему «Иммунная регуляция мезенхимных стволовых клеток и их потомков в очагах эктопического кроветворения», выполненная под руководством Бигильдеева Алексея Евгеньевича и Лейнсоо Арво Тоомасовича и представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, является завершённым научно-квалификационным трудом, в котором содержится решение научной задачи, имеющей существенное значение для развития молекулярной биологии и гематологии.

Работа соответствует требованиям, предъявляемым кандидатским диссертациям, обладает научной новизной, обоснованностью выводов и практической значимостью.

С учетом вышеизложенного, рецензируемая диссертация полностью соответствует требованиям пункта 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013г., предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, Карпенко Дмитрий Владимирович, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 3.1.28. Гематология и переливание крови и 1.5.3. Молекулярная биология.

Официальный оппонент:

ведущий научный сотрудник
лаборатории клинической и геномной биоинформатики
ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова
(Сеченовский Университет)
Согласна на обработку персональных данных

Кандидат биологических наук

Сунцова Мария Владимировна

Подпись к.б.н. Сунцовой М.В. заверяю

Ученый секретарь ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова
(Сеченовский Университет) доктор медицинских наук,
профессор

О.Н. Воскресенская



Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования
Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Министерства
здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)
Адрес: 119991, Российская Федерация, г. Москва, ГСП-1, ул. Трубецкая, д.8, стр. 2,
Телефон: +7(495)609-14-00, Факс +7(499)248-01-81,
Web-сайт: <https://www.sechenov.ru> E-mail: rectorat@staff.sechenov.ru

«30 апреля 2025 г.