

Отзыв официального оппонента

доктора медицинских наук, профессора Онищенко Нины Андреевны на диссертационную работу Андрея Владимировича Ельчанинова «Молекулярные и клеточные механизмы регенерации печени после субтотальной резекции в эксперименте», представленную на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 03.03.04-клеточная биология, цитология, гистология

Актуальность темы исследования.

Благодаря совершенствованию хирургической техники уже в настоящее время стало возможным выполнение в клинике операций субтотальной резекции печени (до 70% и более) при тяжёлых онкологических и паразитарных заболеваниях этого органа. Однако послеоперационный период у таких больных осложняется развитием тяжёлой печёночной недостаточности, смертность при которой, по данным последних лет, достигает 7%. Выше указанное позволяет признать, что поиск путей обеспечения эффективной и надёжной восстановительной регенерации печени после субтотальной резекции остаётся актуальной проблемой современной медицины.

Длительная история изучения восстановительных процессов в печени показывает, что печень относится к органам с высоким регенерационным потенциалом. Однако, регенерация печени после массивной субтотальной резекции, когда печени нанесена травма критического объёма, которая должна нарушить обычный ход регенерационного процесса, оказалась наименее изученной. Исследования в этой области гепатологии остаются неполными и фрагментарными, без динамической оценки состояния и роли клеток (в том числе прогениторных клеток) и тех механизмов, которые участвуют в обеспечении регенерационных процессов на ранних сроках, а

также без изучения и применения каких-либо методов терапевтической индукции восстановительных процессов в малом остатке органа.

Необходимость повышения эффективности и результативности операций субтотальной резекции печени в клинике и отсутствие исследований по оценке состояния ведущих клеточных и молекулярных механизмов регуляции восстановительных процессов в сохранившемся остатке органа, в том числе с помощью современных методов терапии, позволяет признать, что диссертационная работа Ельчанинова А.В. «Молекулярные и клеточные механизмы регенерации печени после субтотальной резекции в эксперименте» выполнена на актуальную тему, т.к. отвечает запросам современной медицинской науки. Однако, эта работа характеризуется не только актуальностью темы исследования. Её отличает чёткая постановка задач, высокий современный методический уровень их решения с использованием высокоточного специализированного оборудования, а также грамотная обработка полученных результатов с применением комплекса адекватных методов статистической обработки материала. Всё это позволило автору получить ряд новых убедительных фактов, важных для науки и медицины.

Научная новизна полученных результатов.

В работе убедительно показано, что после субтотальной резекции печени (80%) у крыс в сохранившемся остатке органа сохраняется регенерационный потенциал на достаточно высоком уровне, реализация которого, однако, имеет свои особенности. Так при динамическом наблюдении автором впервые установлено, что в течение первых 30 часов после субтотальной резекции в печени развивается временный блок митотического цикла гепатоцитов, который наступает на этапе выхода этих клеток из G^0 -периода. Торможение пролиферации гепатоцитов сопровождается низким содержанием фактора некроза - $TNF\alpha$ и гепатоцитарного фактора роста - HGF в печени, при этом временный блок

пролиферации не сопровождается апоптотической гибелью гепатоцитов. Установлено, что ведущим механизмом регенерации печени является пролиферация гепатоцитов, тогда как ожидаемого повышения активности прогениторных клеток печени для ускорения регенерации не происходит, что подтверждается снижением активности генов NOTCH-сигнального пути.

Показано, что после удаления 80% массы печени крыс масштабная пролиферация гепатоцитов характеризуется двумя пиками митотической активности гепатоцитов. Другой особенностью явилось увеличение длительности периода высокой активности пролиферации гепатоцитов, что обеспечивается экспрессией в них транскрипционного фактора малодифференцированных клеток SOX9, указывающего на развитие их дедифференцировки.

Субтотальная резекция печени приводит к повышению экспрессии генов-регуляторов регенерации – *il6*, *hgf*, *fgf2* и др., не только в сохранившемся остатке печени, но также в легких и в почках, т.е. в органах, участвующих в детоксикации и поддержании гомеостаза в организме. В печени после субтотальной резекции выявлено два периода повышенной активности исследуемых генов цитокинов и факторов роста. В легких и почках в течение первых 30 ч после субтотальной резекции повышается экспрессия генов - провоспалительного цитокина *il6*, противовоспалительного *il10*, генов факторов роста, регулирующих пролиферацию гепатоцитов – *hgf* (фактора роста гепатоцитов), *fgf2* (фактора роста фибробластов), что позволяет достигнуть необходимого уровня стимуляции пролиферации гепатоцитов в резецированной печени.

В работе впервые показано, что субтотальная резекция печени не только повышает пролиферацию гепатоцитов, но и увеличивает пролиферацию макрофагов, являющихся неременными участниками процесса восстановительной регенерации гепатоцитов. Отмечено также, что их пролиферация сопровождается компенсаторной активацией экспрессии генов цитокинов- *il1b*, *il6*, *il10*, запускающих регенерационный процесс, и что

в регенерации печени принимают участие преимущественно резидентные макрофаги- клетки Купфера, которые имеют фенотип M2- прорегенераторных макрофагов.

Установлено, что трансплантация мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (МСК) пупочного канатика в селезёнку с целью индукции регенераторного процесса после резекции почти на 30% увеличивает выживаемость подопытных крыс, на 50% повышает пролиферацию гепатоцитов и на этом фоне (в течение 10 суток) снижает общее количество макрофагов в печени, но увеличивает среди них долю M2 макрофагов, а также стимулирует восстановление энергетических функций митохондриального аппарата клеток печени. При этом введенные клетки быстро элиминируются органами макрофагами и не дифференцируются в какой-либо из типов клеток печени.

Теоретическая и практическая значимость полученных результатов

В диссертационной работе автором сформулированы фундаментальные представления о молекулярных и клеточных механизмах восстановительной регенерации печени млекопитающих после субтотальной резекции; выявлены особенности клеточных реакций, а также межклеточных и межорганных взаимодействий в процессе восстановления массы печени. В частности показано, что восстановление массы печени происходит преимущественно за счёт ускоренной пролиферации гепатоцитов и резидентных макрофагов и что пролонгированной пролиферации гепатоцитов сопутствует их дедифференцировка, о чём свидетельствует длительное выявление экспрессии SOX9- маркера малодифференцированных (прогениторных) клеток; в работе получены прямые доказательства, что регенерация печени обеспечивается изменением в клетках печени программы функционирования определённых групп генов за счёт их дерепрессии как в ранней (*il 6, il 10, inos, mmp9, fgf2, tgfb, fn14 sox9*), так и в поздней фазе (*il1b,*

infa, tweak, inos, hgf) восстановительного процесса. Впервые установлено, что при субтотальной резекции имеет место перепрограммирование работы генома не только клеток печени, но также клеток почек и лёгких- органов системы детоксикации организма, в которых компенсаторно уже на ранних сроках после резекции повышается экспрессия генов цитокинов и факторов роста. Впервые установлено, что перепрограммирование работы генома клеток обусловлено остро возникающим дефицитом цитокинов и ростовых факторов, запускающих регенераторный процесс в печени (TNF α и HGF). Впервые показано, что регенерация печени и восстановление её массы после субтотальной резекции не сопровождается активацией региональных прогениторных клеток (подавление экспрессии генов *notch 1 notch 2* NOTCH- сигнального пути) и что введение прогениторных клеток в виде МСК пупочного канатика повышает эффективность регенерационного процесса в печени, который, однако, происходит без дополнительного усиления экспрессии генов цитокинов и факторов роста. Последнее, как полагает автор, может быть связано с иммуномодулирующим типом воздействия МСК, которое в настоящее время рассматривается как результат паракринных эффектов этих клеток на организм.

Полученные данные о регенераторных возможностях печени крыс после её субтотальной резекции не только расширяют наши представления о диапазоне регенераторных резервов печени млекопитающих, но и убеждают в возможности эффективного использования этих резервов при необходимости осуществления в клинике субтотальной резекции. Особенно это касается результатов изучения закономерностей пролиферации гепатоцитов после травмы критического объема с применением МСК. Выявление автором активного участия популяции резидентных макрофагов печени (прежде всего М-2макрофагов), а также вклада легких и почек как детоксикационных систем организма в регенерацию печени млекопитающих - позволяет определить направление поиска новых путей активизации регенерации печени, прицельно воздействующих на эти клетки

и органы для ускоренного устранения возникающего дефицита цитокинов (TNF α) и факторов роста (HGF), а также ускоренного деблокирования митотической активности гепатоцитов.

Кроме того, созданная автором модель острой печеночной недостаточности у крыс путём резекции 80% массы печени может рассматриваться как адекватная модель синдрома малого остатка органа и это позволяет использовать её для доклинических испытаний новых способов лечения острой печёночной недостаточности.

Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и рекомендаций диссертационной работы.

Обоснованность и достоверность результатов диссертационной работы А.В. Ельчанинова не вызывают сомнения так как:

- цели и задачи исследования были сформулированы автором после глубокого и всестороннего анализа теоретических, методологических и фактических достижений предшествующих исследователей, что позволило установить отсутствие в литературе чётких представлений о клеточных и молекулярных механизмах регенерации печени после субтотальной резекции, а также о возможных путях ускорения этого процесса для снижения опасности развития необратимости повреждения и гибели от острой печёночной недостаточности в раннем послеоперационном периоде.

- работа выполнена на достаточном количестве экспериментальных животных – 196 крыс-самцов породы Вистар. Все животные были разделены на 8 опытных (животные с моделью субтотальной резекции) и контрольных групп, причём в качестве контрольных использовались интактные и ложно оперированные животные и в каждую группу было включено достаточное количество животных;

- исследование проводилось с использованием большого комплекса адекватных и современных методов исследования, которые включали

культуральные методы выделения и исследования фенотипических свойств МСК пупочного канатика крыс, биохимические исследования крови (альбумин, АЛТ), ИФА-анализ содержания в ткани печени белка HGF, гистологические исследования печени с подсчётом митотического индекса гепатоцитов, иммуногистохимические исследования с 15 маркерами для выявления различных типов дифференцированных и малодифференцированных клеток печени, а также для выявления клеточного апоптоза и тканевой экспрессии цитокинов. Для количественного определения содержания белков TNF α и TGF β в печени проводился Вестерн-блот анализ, для оценки экспрессии отдельных генов использовали метод ПЦР в реальном времени; функциональное состояние клеток печени оценивали в опытах с МСК пупочного канатика по активности их митохондриального дыхания и по содержанию в митохондриях цитохромов а, в и с;

- полученные результаты были подвергнуты тщательной статистической обработке с применением адекватных программ и методов их оценки, в том числе с использованием z-критерия и критерия Манна-Уитни;

Именно поэтому выводы, изложенные в конце диссертации, не вызывают сомнений и логично вытекают из результатов проведенной работы; результаты работы внедрены в педагогический процесс 2-х высших образовательных медицинских учреждений г. Москвы. Кроме того, достоверность полученных результатов позволяет признать обоснованным выдвинутое на их основании положение о возможности разработки и применения новых способов повышения эффективности регенерационных процессов в печени после субтотальной резекции, путём активизации функции макрофагов печени и органов системы детоксикации -лёгких и почек.

Общая характеристика содержания диссертации

Диссертационная работа А.В.Ельчанинова написана по традиционному плану и представляет собой завершённое исследование, т.к. в нём была достигнута поставленная цель - проведено изучение молекулярных и клеточных механизмов регенерации печени крыс после субтотальной резекции, а также решены все чётко сформулированные задачи исследования. Работа изложена на 233 страницах компьютерного текста и состоит из введения, развернутого обзора литературы, свидетельствующего о глубоком проникновении автора в исследуемую проблему (глава 1), подробного описания материалов и методов исследования (глава 2), детального описания результатов проведенных исследований, состоящего из 8 разделов, которые отражают содержание научной новизны, теоретической и практической значимости проведенного исследования (глава 3), грамотного обсуждения полученных результатов, свидетельствующего о хорошей медико-биологической подготовке автора (глава 4). заключения и выводов. Диссертация достаточно полно иллюстрирована, что убеждает в подлинности представленных материалов и существенно облегчает восприятие излагаемых результатов; содержит 54 корректно выполненных рисунка, из которых 21 представляют собой фотографии нативных качественно выполненных гистологических препаратов. Список цитируемой литературы включает 287 источников (20 отечественных и 267 зарубежных), который свидетельствует о современном и достаточно глубоком освещении автором изучаемой проблемы.

Личный вклад соискателя в выполнение представленной диссертации состоял в планировании и проведении исследования, в получении фактического материала и его статистической обработке, в обобщении и анализе полученных результатов, подготовке публикаций. Соискателем самостоятельно проработана современная отечественная и зарубежная литература по теме диссертации. Автором лично подготовлен

материал (ткань печени) к исследованию и проведены гистологическое окрашивание и иммуногистохимические реакции, самостоятельно выполнены микроскопический и морфометрический анализ полученных препаратов, подготовлены публикации и доклады.

Основные положения диссертации неоднократно докладывались на тематических конференциях и конгрессах как в нашей стране так и за рубежом и получали позитивные отзывы специалистов.

Результаты проведенной работы нашли отражение в 17 публикациях, из которых 12 в виде статей были напечатаны в журналах, входящих в Перечень рецензируемых научных изданий РФ, предназначенных для публикаций основных научных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук и ученой степени доктора наук. В автореферате и публикациях полностью отражено основное содержание диссертации.

Принципиальных замечаний по представленной работе не имею.

Заключение

Диссертация А.В. Ельчанинова «Молекулярные и клеточные механизмы регенерации печени после субтотальной резекции в эксперименте» является законченной научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований разработаны теоретические и практические положения и выводы, совокупность которых можно квалифицировать как новое крупное научное достижение в области изучения закономерностей репаративной регенерации печени млекопитающих. Результаты исследования имеют важное теоретическое и практическое значение для цитологии, гистологии и клеточной биологии, а также биологии развития и регенеративной медицины.

По актуальности, новизне, высокому методическому и научному уровню, теоретической и практической значимости, достоверности полученных результатов диссертация Ельчанинова Андрея Владимировича

соответствует требованиям пп. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней» ВАК Минобрнауки РФ (Постановление Правительства РФ от 24.09.2013 г. №842 с изменениями от 21 апреля 2016 г №335), предъявляемым к диссертациям, представленным на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 03.03.04 - клеточная биология, цитология, гистология, а сам автор заслуживает присуждения ученой степени доктора медицинских наук по специальности 03.03.04 - клеточная биология, цитология, гистология.

Главный научный сотрудник
отдела биомедицинских технологий и тканевой инженерии
ФГБУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова»

Минздрава России,

123182, г. Москва, Щукинская улица,

дом 1.,

тел. +7 (495) 544-18-00,

<http://transpl.ru>.

доктор медицинских наук по специальности

14.03.03 – патологическая физиология,

профессор

Онищенко Нина Андреевна

Подпись профессора Онищенко Н.А. заверяю

Ученый секретарь

ФГБУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России



Проф. Онищенко Н.А.
З А В Е Р Я Ю
Ученый секретарь к.м.н. Великий Д.А.
29.05.2017г.