

## **ОТЗЫВ ОФФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА**

доктора медицинских наук Темнова Андрея Александровича

о диссертации Ельчанинова Андрея Владимировича

на тему: «Молекулярные и клеточные механизмы регенерации печени крыс после субтотальной резекции в эксперименте», представленной на соискание ученой степени

доктора медицинских наук по специальности

03.03.04 – гистология, цитология, клеточная биология

### **Актуальность темы исследования**

В диссертационном исследовании Ельчанинова А.В. приводятся данные, посвященные изучению молекулярных и клеточных механизмов регенерации печени после субтотальной резекции в эксперименте, а также механизмам стимулирующего влияния мультипотентных стромальных клеток пупочного канатика на репаративные процессы. Репаративная регенерация печени после субтотальной резекции мало изучена, что затрудняет выяснение причин развития синдрома малого остатка печени, который развивается у пациентов после удаления 60-70% тканей печени в связи с ее раком. При синдроме малого остатка печени наблюдается нарушение репаративных процессов в органе, при этом причины этого неизвестны, что делает актуальным изучение выраженности апоптотической гибели гепатоцитов, причин митотического блока гепатоцитов, роли резидентных прогениторных клеток печени в регенерации.

Для изучения механизмов репаративной регенерации печени в условиях малого остатка печени Ельчаниновым А.В. была воспроизведена модель восстановления массы печени после субтотальной резекции у крыс, было сформулировано ряд задач, которые решались с помощью комплекса молекулярно-биологических, иммуногистохимических, морфометрических методов. Главными показателями динамики репаративного процесса были восстановление массы печени, биохимические показатели функции печени, а также пролиферативная активность гепатоцитов, которая изучалась с помощью подсчета митотического индекса гепатоцитов и выявления маркера пролиферации Ki-67.

Работа является завершенным фундаментальным трудом, который написан хорошим научным языком по традиционной схеме, содержит большое количество цветных иллюстраций высокого качества, схем, графиков и таблиц. Автором проведен глубокий критический анализ изучаемой проблемы, рассмотрен и проанализирован широкий спектр существующих подходов по ее исследованию. В работе использованы современные молекулярно-биологические, иммуногистохимические и морфологические методы исследования. Диссертационная работа изложена на 233 страницах

машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов собственных исследований, обсуждения полученных результатов, заключения и выводов.

Работа иллюстрирована 54 рисунками и 5 таблицами. Список литературы включает 287 источников из них 20 отечественных и 267 зарубежных.

### **Оценка научной новизны и ценности полученных результатов**

Научная новизна диссертации заключается в том, что в ходе исследования репаративной регенерации после субтотальной резекции печени у крыс с помощью современных методов впервые установлено, что нарушение регенерации печени после критической резекции связано, прежде всего, с нарушением пролиферации гепатоцитов, а увеличение уровня апоптоза гепатоцитов не выявлено. Показано, что блок митотического цикла гепатоцитов после субтотальной резекции наблюдался в течение 30 часов в связи с блоком при выходе из G<sub>0</sub>-периода. Нарушение пролиферации гепатоцитов связано с низким содержанием фактора некроза - TNF $\alpha$  и гепатоцитарного фактора роста - HGF в печени.

Фундаментальный характер носят данные, касающиеся клеточных механизмов восстановления массы печени. В диссертационном исследовании автором установлено, что ведущим механизмом регенерации печени является пролиферация гепатоцитов, а активация прогениторных клеток печени не носит выраженный характер, что подтверждается динамикой количества клеток, экспрессирующих СК19, а также снижением активности генов NOTCH-сигнального пути.

Установлено, что пролиферация гепатоцитов после удаления 80% массы печени крыс носит масштабный характер, и выражается в двух пиках митотического индекса. Другой отмеченной особенностью была большая длительность периода высокой активности пролиферации, что обеспечивается экспрессией в гепатоцитах транскрипционного фактора малодифференцированных клеток SOX9.

Субтотальная резекция печени приводит к повышению экспрессии генов-регуляторов регенерации – *il6*, *hgf*, *fgf2* и др., как в ней, так и в легких и почках. В печени после субтотальной резекции выявлено два периода повышенной активности исследуемых генов цитокинов и факторов роста. В легких и почках в течение 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 необходимо для стимуляции пролиферации гепатоцитов. Экспрессия фактора роста гепатоцитов HGF оценивалась и по содержанию белка в легких и печени. Установлено,

что после субтотальной резекции происходит увеличение содержания данного фактора роста.

Субтотальная резекция оказывала выраженное влияние на популяцию макрофагов печени - после субтотальной резекции происходит увеличение количества макрофагов. Ведущим механизмом нарастания популяции макрофагов является их пролиферация, которая была наиболее выражена через 48 часов после резекции. Миграция макрофагов в печень имела меньшее значение, так как все макрофаги были представлены резидентными клетками, которые не экспрессируют маркер макрофагов производных моноцитов.

**Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций,** изложенных в диссертации, находится на высоком научном уровне. Это обусловлено глубоким анализом достижений исследователей, занимавшихся этой проблемой, обширной эмпирической базой данных, использованием оригинальных подходов изучения репаративной регенерации печени после субтотальной резекции у крыс, обстоятельным и критическим анализом полученных данных и адекватными статистическими методами обработки данных.

В работе было использовано 196 самцов крыс Вистар, которые были разделены на опытные и контрольные группы, в качестве которых использовались интактные и ложноперирированные животные. У каждого животного исследована экспрессия генов, регулирующих регенерацию печени, изучена митотическая активность и выраженность апоптоза гепатоцитов, динамика иммуногистохимических маркеров прогениторных клеток печени, разных популяций макрофагов.

Таким образом, научные положения и выводы диссертации аргументированы и достоверны, наиболее важная часть, которых внедрена в педагогический процесс.

Основные положения диссертации изложены в 17 работах, из них 12 статей в журналах, входящих в Перечень РФ рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук и ученой степени доктора наук.

#### **Научно-практическая значимость**

Диссертация А.В. Ельчанинова является фундаментальным исследованием, результаты которого вносят значимый вклад в решение ряда актуальных проблем цитологии и гистологии и поднимают на новый качественный уровень знания тех ее разделов, которые занимаются изучением механизмов регенерации печени млекопитающих. В работе выявлен блок митотического цикла в ранние сроки после субтотальной резекции печени, обусловленный низким содержанием фактора некроза -

TNF $\alpha$  и гепатоцитарного фактора роста - HGF в печени, установлено компенсаторное повышение экспрессии регуляторных генов в легких и почках. Исходя из полученных данных, сделано предположение, что звеньями, на которые необходимо воздействовать для стимуляции репаративного процесса, является популяция макрофагов печени, которая индуцирует пролиферацию гепатоцитов, синтезируя TNF $\alpha$ , и звездчатые клетки, секретирующие HGF, а также легкие и почки, как дополнительные источники синтеза HGF.

Показана принципиальная возможность коррекции нарушения регенерации после субтотальной резекции печени с помощью МСК пупочного канатика, которые оказывают паракринный эффект. Получены данные, открывающие перспективы для использования клеточной терапии пациентов с синдромом малого остатка печени. Для разработки эффективных методов клеточной терапии заболеваний печени необходимо учитывать полученные данные о миграции и скорости элиминации МСК при их трансплантации в селезенку.

**Личный вклад соискателя** заключался в планировании и проведении исследования, статистической обработке, обобщении и анализе полученных результатов, подготовке публикаций. Соискателем самостоятельно проработана современная отечественная и зарубежная литература по теме диссертации. Автором лично подготовлен материал и проведены гистологическое окрашивание и иммуногистохимические реакции, самостоятельно выполнены микроскопический и морфометрический анализ полученных препаратов, подготовлены публикации и доклады.

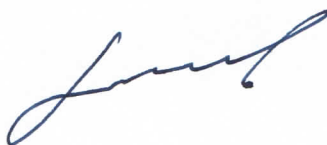
Принципиальных замечаний по представленной работе нет.

### **Заключение**

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

По актуальности, новизне, научному и методическому 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 присвоения ученой степени доктора медицинских наук по специальности 03.03.04 - клеточная биология, цитология, гистология.

доктор медицинских наук по специальности  
14.03.03 – патологическая физиология,  
14.00.41. - трансплантология и  
искусственные органы  
ведущий научный сотрудник  
лаборатории редактирования генома  
Федерального государственного бюджетного  
учреждения «Государственный научный  
центр Российской Федерации –  
Федеральный медицинский  
биофизический центр имени  
А.И. Бурназяна» ФМБА России



Темнов Андрей Александрович

123182, Москва, ул. Живописная, д. 46.,

тел. +7 499 190-95-00,

<http://www.fmbafmbc.ru/>

fmbc-fmba@bk.ru

Подпись Темнова А.А. заверяю

Ученый секретарь

ФГБУ «Государственный научный центр ФМБЦ им А. И. Бурназяна»

К.м.н.



Голобородько Е.В.