

## **ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА**

доктора медицинских наук, доцента

Гумеровой Анисы Азатовны

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**

Диссертация Ельчанинова А.В. посвящена изучению молекулярных механизмов регенерации печени после субтотальной гепатэктомии у крыс. Резекция печени такого объема как правило сопровождается нарушениями процесса регенерации органа, причины которых остаются малоизученными. Этот факт определяет актуальность диссертационного исследования как в отношении выяснения возможных механизмов, лежащих в основе этих нарушений (таких как пролиферация, апоптоз, экспрессия регуляторных генов и кодируемых ими факторов роста и цитокинов, динамика изменений качественного и количественного состава отдельных клеточных популяций печени, активация стволового компартмента), так и в отношении поиска путей стимуляции регенерации после субтотальной резекции печени с использованием мезенхимных стволовых клеток. Поиск взаимосвязей между уровнем экспрессии регуляторных генов, секрецией факторов роста и цитокинов как возможными факторами, приводящими к нарушению/замедлению механизмов регенерации, и клеточными реакциями, развивающимися в печени после субтотальной резекции, позволяет приблизиться к пониманию процессов и закономерностей регенерации печени в целом, а также открывает перспективы разработки методов генной и клеточной терапии заболеваний печени. Акцент исследования сделан на гепатоцитах, макрофагах и предполагаемых прогениторных клетках печени, что абсолютно оправдано. Однако не вполне понятно исключение из

исследования популяций звездчатых и эндотелиальных клеток печени, чье участие в регенерации органа несомненно не менее значимо, в том числе и с точки зрения секреции ими важнейших для регенерации печени цитокинов, в частности, фактора роста гепатоцитов (HGF), основным источником которого в печени являются именно звездчатые клетки печени, и секреции которого посвящена значительная часть работы. Вместе с тем автором было проведено изучение экспрессии генов-регуляторов регенераторного ответа в печени в почках и печени, что, безусловно, является важным аспектом исследования. Следует отметить однако, что и эта часть исследования имела бы большую значимость при одновременном выявлении клеточных типов, экспрессирующих данные гены в выбранных органах, тем более что и в легких, и в почках имеются клеточные типы, родственные звездчатым клеткам и звездчатым макрофагам печени.

Автором проведен анализ литературы по изучаемой проблеме, рассмотрен и проанализирован широкий спектр существующих подходов к ее исследованию. Следует отметить высокий методический уровень работы. Комплексное применение А. В. Ельчаниновым современных методов молекулярно-генетического анализа, методов иммуногистохимического и иммунофлуоресцентного окрашивания, морфометрического и статистического анализа при выполнении диссертации несомненно определяют научную новизну и достоверность полученных результатов.

Диссертационная работа объемом 233 страницы машинописного текста изложена в традиционном стиле и состоит из введения, обзора литературы, изложения материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, обсуждения, заключения и выводов. Работа содержит 5 таблиц и 54 рисунка, включающих микрофотографии высокого качества и диаграммы, которые облегчают восприятие материала диссертации, однако сами рисунки размещены в диссертации с нарушением последовательности относительно текста диссертации, и ориентироваться в них весьма затруднительно.

## Оценка научной новизны и ценности полученных результатов

Диссертантом впервые выдвинуто и на большом фактическом материале подтверждено положение, что главным механизмом, нарушающим течение репаративного процесса в печени после субтотальной резекции, является временный блок митотического цикла гепатоцитов при выходе из G<sub>0</sub>-периода. При этом было убедительно показано, что апоптотическая гибель гепатоцитов не сопровождает этот процесс. Автором были исследованы возможные механизмы нарушения митотической активности гепатоцитов, и впервые было установлено, что в печени после субтотальной резекции отмечается низкое содержание фактора некроза опухолей TNF- $\alpha$  и IL-6, стимулирующих вступление гепатоцитов в митотический цикл, и значительное снижение уровня основного митогена гепатоцитов HGF, что могло стать причиной временного блока пролиферации гепатоцитов. В тоже время было показано, что пик пролиферативной активности гепатоцитов наблюдается на фоне низкого уровня TGF- $\beta$ , известного в том числе и ингибирующим действием на пролиферацию. Также в работе установлено участие FGF2 и TWEAK сигнального пути в стимулировании пролиферации гепатоцитов.

В диссертационном исследовании получен ряд важных фактов, касающихся фундаментальных аспектов регенерации печени. Так, было установлено, что несмотря на чрезвычайно большой объем резекции, основным механизмом восстановления массы печени была пролиферация гепатоцитов, а существенной активации прогениторных клеток печени не происходило, что подтверждается снижением активности генов NOTCH-сигнального пути. Однако автором рассмотрена лишь одна, доминирующая, но далеко не бесспорная теория о локализации прогениторных клеток печени (так называемых овальных клеток) в канальцах Геринга. При этом установлен факт экспрессии гепатоцитами транскрипционного фактора SOX9 – одного из маркеров прогениторных клеток – в ядрах гепатоцитов, причем максимум экспрессии совпадает по времени с пиками

пролиферативной активности гепатоцитов, что, по-видимому, все-таки может свидетельствовать об активации стволового компартмента. Очевидно, что данный аспект регенерации печени после субтотальной резекции требует дальнейшего специального исследования.

В ходе изучения популяции макрофагов в регенерирующей печени Ельчаниновым А.В. также получен ряд принципиально новых фактов. Так, было показано, что большинство макрофаги печени в ходе регенерации было представлено резидентными клетками, то есть миграция макрофагов костномозгового происхождения в печень не играла существенной роли. Выявление митотически делящихся макрофагов при этом указывает на то, что главным механизмом увеличения числа макрофагов в печени во время регенерации после субтотальной резекции является пролиферация резидентных клеток.

#### **Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций**

В ходе исследования был сформулирован ряд положений и выводов, которые логически вытекают из полученных результатов, что обусловлено достаточным объемом изученного фактического материала и использованием комплекса оригинальных методов исследования и анализа, адекватных поставленным автором цели и задачам работы. Качество статистической обработки полученных результатов и ее анализ также подтверждают достоверность полученных данных. Тщательная документация результатов работы, их критическое сопоставление с данными литературы, выполнение статистического анализа полученных результатов делают научные положения, выводы и рекомендации работы обоснованными и соответствующими поставленным задачам. Выводы и положения логично вытекают из содержания диссертационной работы.

Материалы диссертации апробированы на национальных и международных конгрессах, внедрены в педагогический процесс кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии РНИМУ им. Н.И. Пирогова, кафедры

гистологии, цитологии и эмбриологии РУДН. Основные положения диссертации в полной мере изложены в 17-ти публикациях, в том числе в 12-ти статьях в журналах, рекомендованных ВАК для публикации материалов кандидатских и докторских диссертаций.

### **Научно-практическая значимость**

Результаты диссертационного исследования об особенностях регенерации печени млекопитающих после субтотальной резекции вносят существенный вклад в теорию регенерации печени и являются фундаментальными. В работе с помощью комплекса молекулярно-биологических и гистологических методов обосновано положение о ведущей роли блока пролиферации гепатоцитов в развитии нарушения репаративной регенерации печени после субтотальной резекции. На основании этого открываются перспективы по разработке методов стимуляции репаративных процессов в печени при синдроме малого остатка. Важной частью диссертационного исследования Ельчанинова А.В. является раздел, касающийся изучения механизмов терапевтической активности МСК пупочного канатика, что имеет важное значение для развития клеточных технологий и их внедрения в клиническую практику. Обнаружено, что трансплантация МСК пупочного канатика способна стимулировать регенерацию печени после субтотальной резекции посредством паракринного эффекта.

**Личный вклад соискателя** не вызывает сомнения. Ельчанинов А.В. планировал экспериментальное исследование, выполнял субтотальную резекцию у всех экспериментальных животных, самостоятельно проводил гистологическое исследование экспериментального материала, постановку иммуногистохимических реакций, статистическую обработку, обобщение и анализ полученных результатов, подготовил к печати статьи по теме диссертационного исследования. Соискателем самостоятельно проанализирована современная отечественная и зарубежная литература по теме диссертации. Выводы работы соответствуют полученным результатам и

поставленным задачам исследования. Автореферат диссертации соответствует существующим требованиям ВАК РФ и полностью отражает содержание диссертации.

Принципиальных замечаний по работе нет. Однако при ознакомлении с диссертацией возникли следующие вопросы:

1. Как можно объяснить низкий уровень TGF- $\beta$  до 10 суток после частичной гепатэктомии при том, что экспрессия соответствующего гена была повышена уже через 6 часов? Нет ли здесь ошибки/противоречия?
2. Почему HGF определяли в гомогенатах печени? Почему не изучали его присутствие в клетках печени иммуногистохимически, что более наглядно и дает возможность установить секретирующие HGF клеточные типы?
3. Как именно было выявлено повышение экспрессии цитокератина 19? По представленным в диссертации фотографиям это не прослеживается, а по данным Вестерн-блот разницы в уровне белка между опытом и контролем нет?
4. Чем объясняется отсутствие 2-го пика по Ki-67?

### **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 области молекулярной биологии, цитологии, гистологии регенерации печени. Результаты исследования имеют важное теоретическое и практическое значение для клеточной биологии, гепатологии и регенеративной медицины.

По актуальности, новизне, научному и методическому уровню, теоретической и практической значимости, достоверности полученных

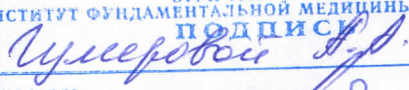
результатов диссертация Ельчанинова Андрея Владимировича соответствует требованиям пп. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней» ВАК Минобрнауки РФ (Постановление Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями от 21 апреля 2016 г № 335), предъявляемым к диссертациям, представленным на соискание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

Профессор кафедры  
морфологии и общей патологии  
Института фундаментальной медицины и биологии  
ФГАОУ ВО Казанский (Приволжский)  
федеральный университет,  
доктор медицинских наук по специальности  
03.03.04 - клеточная биология, цитология, гистология,  
доцент

  
Гумерова Аниса Азатовна

ФГАОУ ВО Казанский (Приволжский)  
федеральный университет,  
420008, Россия, РТ, г. Казань, ул. Кремлевская, д.18.  
тел. +7 (843) 233-71-09,  
<http://kpfu.ru>  
[public.mail@kpfu.ru](mailto:public.mail@kpfu.ru)



МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ФГАОУ ВО «КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
ОГРН 10216022841391  
ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ  
ПОДПИСИ  
 заверяю  
секретарь

26.05.17г.

  
Музнецова Н.Н.