

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение
высшего образования
«ВОРОНЕЖСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени Н.Н. БУРДЕНКО»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(ФГБОУ ВО ВГМУ им. Н.Н.Бурденко
Минздрава России)
ул. Студенческая, д.10, Воронеж, 394036
Тел. (473)259-38-05, Факс: (473)253-00-05
E-mail: mail@vrngmu.ru

24.05.2017 № 20-681

УТВЕРЖДАЮ
Проректор по научно-инновационной
деятельности
ФГБОУ ВО ВГМУ
им. Н.Н. Бурденко Министерства
здравоохранения РФ
А.В. Будневский
_____ 2017г.



ОТЗЫВ ВЕДУЩЕГО УЧРЕЖДЕНИЯ

о научно-практической ценности 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 выполненной работы

Диссертация Ельчанинова А.В. посвящена решению актуальных проблем современной медицинской науки, а именно изучению регенерации печени после субтотальной резекции. Определение морфологического эквивалента синдрома малого остатка органа, который сопровождает в 60-70% случаев резекцию печени по поводу опухоли или метастазов, когда объем паренхимы печени, сохранившийся после операции, не способен обеспечивать гомеостаз, имеет большое значение для выявления возможностей стимуляции регенерации печени, так как резервные возможности данного органа к восстановлению мало изучены.

Представляет также фундаментальный интерес определение молекулярных механизмов пролиферативных процессов, установление роли прогениторных клеток и разных популяций макрофагов при субтотальной резекции печени и участие в регенераторном процессе других органов. Понимание механизмов регенерации печени при субтотальной резекции

позволит клиницистам разработать новые подходы к стимуляции регенераторных процессов.

Для достижения поставленной цели автор сформулировал и оригинально решил ряд задач. В частности была воспроизведена модель регенерации печени после субтотальной резекции, на которой с помощью набора молекулярно-биологических, иммуногистохимических, морфометрических методов были изучены закономерности течения репаративного процесса в печени после критического повреждения. Динамика репаративного ответа оценивалась по увеличению массы оперированной печени и по пролиферативной активности гепатоцитов, которая изучалась с помощью подсчета митотического индекса гепатоцитов и выявления маркера пролиферации Ki-67. Изучалась также выраженность клеточной гибели в печени после субтотальной резекции.

Связь выполненной работы с планом медицинских отраслей науки

Работа Ельчанинова Андрея Владимировича «Молекулярные и клеточные механизмы регенерации печени после субтотальной резекции в эксперименте» выполнена в соответствии с планом НИР Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт морфологии человека» (номер государственной регистрации – 1201158018), а также при финансовой поддержке гранта ФЦП (Соглашение № 8718 от 09.10.2012.), РФФИ (Соглашение 14-04-01224 от 26 декабря 2013 года) и гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых (№ 14.120.14.6239 от 3 февраля 2014 года).

Новизна исследований и полученных результатов

На основании комплекса современных молекулярно-биологических, морфологических, иммуногистохимических определен ведущий фактор, нарушающий регенерацию печени после субтотальной резекции в раннем послеоперационном периоде - блок митотического цикла гепатоцитов. Впервые установлено, что блок митотического цикла гепатоцитов в течение 30 часов после субтотальной резекции происходит при выходе из G₀-периода. Причиной временного блока пролиферации является низкое содержание фактора некроза – TNF α и гепатоцитарного фактора роста – HGF в печени. Исследование показало, что при удалении 80% массы печени крыс отмечается масштабная пролиферация гепатоцитов, для которой характерны два пика митотической активности гепатоцитов, ранний – через 2 суток после

резекции, и поздний – через 7 суток. Длительная пролиферация обеспечивается экспрессией в гепатоцитах транскрипционного фактора малодифференцированных клеток SOX9. При этом, несмотря на временный блок митотического цикла гепатоцитов, не происходит активации резидентных прогениторных клеток печени, а также повышения уровня апоптоза гепатоцитов.

Исследование динамики экспрессии генов ключевых цитокинов и факторов роста, регулирующих репаративные процессы в печени крыс после субтотальной резекции, позволило констатировать повышение экспрессии генов-регуляторов регенерации – *il6*, *hgf*, *fgf2* и др., как в ней, так и в легких и почках, с двумя периодами повышенной активности исследуемых генов цитокинов и факторов роста в печени: ранний – 3-48ч (гены *il6*, *il10*, *inos*, *mmp9*, *fgf2*, *tgfb*, *fn14*), поздний – 5-10-е сутки после операции (гены *il1b*, *tnfa*, *tweak*, *inos*, *hgf*). Двухфазный характер повышения экспрессии генов в печени после субтотальной резекции соответствует двум пикам митотической активности гепатоцитов.

Среди генов с повышенной экспрессией большинство относилось к генам макрофагов. При изучении состояния макрофагальной популяции печени установлено, что все макрофаги печени представлены резидентными клетками, которые имеют фенотип прорегенераторных макрофагов. Миграция в регенерирующую печень макрофагов моноцитарного происхождения не носит выраженного характера. Увеличение доли макрофагов в печени после субтотальной резекции происходит за счет митотического деления резидентных клеток Купфера, при этом пик митотической активности отмечается через 2 суток после удаления 80% тканей печени.

Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Диссертационное исследование основано на изучении экспериментальных данных, полученных при воспроизведении модели регенерации печени после субтотальной резекции у крыс. В работе было использовано 196 самцов крыс Вистар, которые были разделены на опытные и контрольные группы, в качестве которых использовались интактные и ложнопериорированные животные. В каждом случае исследована экспрессия генов, регулирующих регенерацию печени, изучена митотическая активность и выраженность апоптоза гепатоцитов, динамика иммуногистохимических маркеров прогениторных клеток печени, разных популяций макрофагов. Проведен глубокий анализ теоретико-методологических достижений

исследователей, занимавшихся этой проблемой, обстоятельное и критическое обсуждение полученных данных и адекватный статистический анализ.

Таким образом, научные положения и выводы диссертации аргументированы, достоверны и логически следуют из полученных данных.

Конкретные рекомендации по использованию результатов и выводов работы

Данные о миграции трансплантированных МСК пупочного канатика, способности к дифференцировке и влиянии на регенерацию печени могут рассматриваться как доклинические испытания нового способа лечения синдрома малого остатка печени. При этом показана принципиальная возможность коррекции нарушения регенерации после субтотальной резекции печени с помощью МСК пупочного канатика, которые оказывают паракринный эффект.

Значимость для науки и практики данных, полученных автором

Диссертация А.В. Ельчанинова является фундаментальным исследованием, результаты которого вносят значимый вклад в учение о регенерации внутренних органов млекопитающих, поскольку касается мало изученного вопроса репарации тканей и органов после критического повреждения, что тесно связано с такими областями медицины как трансплантология и хирургия печени.

Фундаментальное значение имеет установленный факт, что даже после субтотальной резекции печени у крыс главным клеточным механизмом восстановления массы органа является пролиферация гепатоцитов. Активации резидентных прогениторных клеток не отмечается, при этом экспрессия в гепатоцитах SOX9 отражает их подготовку к длительной и масштабной пролиферации, а не трансдифференцировку в холангиоциты. Это также подтверждается снижением активности NOTCH-сигнального пути.

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.

В работе выявлен блок митотического цикла в ранние сроки после субтотальной резекции печени, обусловленный низким содержанием фактора некроза - TNF α и гепатоцитарного фактора роста – HGF в печени, установлено компенсаторное повышение экспрессии регуляторных генов в легких и почках. Источником синтеза TNF α в печени являются макрофаги, а

HGF - звездчатые клетки. Таким образом, эти клеточные популяции печени являются звеньями, на которые необходимо воздействовать для стимуляции репаративного процесса, а также легкие и почки, как дополнительные источники синтеза HGF.

Личный вклад автора

Автор лично проанализировал данные отечественной и зарубежной литературы по теме диссертационного исследования, определил дизайн исследования, сформулировал цель и задачи работы. Диссертантом лично выполнен забор материала, проведены культивирование клеток млекопитающих (первичных культур и перевиваемых линий), цитохимическое и иммуноцитохимическое окрашивание, обзорное и иммуногистохимическое окрашивание, морфометрические методы, световая и флуоресцентная и микроскопия, проточная цитофлуориметрия, иммуноферментный анализ, ПЦР-РВ, вестерн-блот. Выполнена статистическая обработка и обобщение полученных результатов, сформулированы выводы и написаны публикации.

Работа написана хорошим языком по традиционной схеме, содержит большое количество цветных иллюстраций отличного качества, схем, графиков и таблиц.

Выводы диссертации соответствуют полученным результатам и задачам исследования. Автореферат полностью отражает основные положения диссертации.

Количество печатных работ

Результаты настоящей диссертационной работы в полной мере изложены в 17 публикациях, 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.

Принципиальных замечаний по представленной работе нет.

Заключение

Диссертация А.В. Ельчанинова «Молекулярные и клеточные механизмы регенерации печени после субтотальной резекции в эксперименте», выполненная при консультации д.м.н., доцента Фатхудинова Т.Х. является научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований разработаны теоретические положения, совокупность которых можно квалифицировать как новое крупное научное

достижение в области изучения закономерности физиологической и репаративной регенерации печени, а также роли различных клеточных популяций в этом процессе. Результаты исследования имеют важное теоретическое и практическое значение для цитологии, гистологии и клеточной биологии, биологии развития, регенеративной медицины и трансплантологии.

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), предъявляемым к диссертациям, представленным на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология, а сам автор достоин присвоения ученой степени доктора медицинских наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология.

Отзыв обсужден и утвержден на совместном заседании кафедр нормальной анатомии человека и кафедры гистологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Воронежский государственный медицинский университет имени Н.Н. Бурденко» Министерства здравоохранения Российской Федерации (протокол № 8 от 10 мая 2017 г.).

Заведующий кафедрой нормальной анатомии человека
ФГБОУ ВО ВГМУ им. Н.Н. Бурденко Минздрава России
394036, г. Воронеж, ул. Студенческая, д. 10

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

mail@vrngmu.ru

доктор медицинских наук по специальности
03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология,

доцент

Алексеева Наталия Тимофеевна

Подпись д.м.н., доцента Алексеевой Н.Т. заверяю
Ученый секретарь
ФГБОУ ВО ВГМУ им. Н.Н. Бурденко Минздрава России,
д.м.н., доцент



Л.А. Титова