

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию
Арутюнян Ирины Владимировны «Ангиогенные свойства мультипотентных стромальных клеток пупочного канатика», представленную на соискание
ученой степени кандидата биологических наук по специальности
03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Актуальность темы выполненной работы

Инфаркт миокарда, ишемический инсульт и ишемические заболевания нижних конечностей относятся к наиболее распространенным причинам смертности и инвалидизации населения России. В последние годы отмечается рост заболеваемости инфарктом миокарда и ишемии конечностей, особенно среди лиц молодого и среднего возраста. Несмотря на развитие современных методов лечения, смертность от инфаркта миокарда до сих пор остается высокой. В основе патогенеза инфаркта миокарда лежит острая недостаточность коронарного кровообращения, что приводит к ишемическому некрозу сердечной мышцы и гибели кардиомиоцитов. Стенозирующий атеросклероз сосудов нижних конечностей, приводящий к развитию тяжелой ишемии конечностей и в крайних случаях к развитию гангрены и ампутациям, ассоциирован с 3–6-кратным повышением сердечно-сосудистой заболеваемости и смертности населения. Существующие хирургические методы применимы только для части больных, а существующие консервативные методы лечения неэффективны у значительной части тяжелых больных. В этой связи помимо многокомпонентной медикаментозной терапии, методов эндоваскулярной и хирургической реваскуляризации в мире активно ведутся разработки принципиально новых технологий. Одним из подходов к решению данной проблемы является введение в ишемизированные ткани стволовых/прогениторных клеток. Изучение механизмов, обеспечивающих терапевтическое действие стволовых/прогениторных клеток в зоне введения, является важной задачей современной фундаментальной биологии.

В связи с этим цель исследования Арутюнян И.В. – изучение механизмов реализации ангиогенной активности мультипотентных стромальных клеток пупочного канатика *in vitro* и влияния аллогенной трансплантации мультипотентных стромальных клеток пупочного канатика на регенерацию ишемизированной скелетной мышечной ткани *in vivo* – является актуальной.

Новизна исследования и полученных результатов, выводов, рекомендаций, сформулированных в диссертации

Научная новизна исследования заключается в выявлении характерных фенотипических особенностей МСК (мультипотентные стромальные клетки) пупочного канатика и механизмов их ангиогенного действия *in vitro* и *in vivo*.

Автор впервые подробно изучил вклад основного проангиогенного фактора VEGF (фактор роста эндотелия сосудов) в возможность реализации паракринного и заместительного механизмов стимуляции ангиогенеза МСК пупочного канатика. Автор продемонстрировал, что данный тип МСК способен стимулировать пролиферацию и направленную миграцию эндотелиальных клеток при полном отсутствии VEGF в секрете. Автор также показал, что VEGF-A является необходимым, но недостаточным индуктором эндотелиальной дифференцировки МСК при их культивировании на стандартной подложке; однако, при со-культивировании МСК с эндотелиальными клетками в Матригеле *in vitro*, МСК способны приобретать CD31+фенотип без влияния экзогенного VEGF-A.

На модели ишемии конечности крысы автором обнаружено, что аллогенные МСК распознаются и элиминируются иммунной системой реципиента после внутримышечного введения МСК в ишемизированную скелетную мышцу. Автор впервые количественно оценил динамику элиминации, определив, что уже через 10 суток после трансплантации около половины витально меченных клеток представлены макрофагами, утилизовавшими метку РКН26, а к 30 суткам доля их превышает 75%.

На той же модели автор впервые выявил подавляющее влияние МСК на

интенсивность макрофагальной инфильтрации в области ишемического повреждения скелетной мышцы и одновременное стимулирующее влияние МСК на активацию прорегенераторных M2 макрофагов.

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

К достоинствам работы можно отнести четкую постановку задач, структурированность исследования и обоснованное обсуждение полученных результатов. На первом этапе гистологическими и цитологическими методами было охарактеризовано строение пупочного канатика. Далее были получены первичные культуры МСК из пупочного канатика человека и крысы; фенотип мультипотентных стромальных клеток был подтвержден методом проточной цитофлуориметрии. На втором этапе был проанализирован пролиферативный и дифференцировочный потенциал МСК *in vitro*, исследованы возможные механизмы паракринного и заместительного действия МСК, обеспечивающие ангиогенные эффекты этих клеток. На третьем этапе на модели ишемии задней конечности крысы был проанализирован регенеративный потенциал МСК и их способность стимулировать восстановление кровоснабжения в ишемизированной скелетной мышце при аллогенной трансплантации *in vivo*.

В работе использованы современные методы клеточной биологии и физиологии: культивирование клеток *in vitro*, проточная цитофлуориметрия, иммуноферментный анализ, колориметрический МТТ-тест, исследование миграции клеток с использованием transwell-системы и «раны монослоя», модель ангиогенеза в Матригеле *in vitro*, модель ишемии задних конечностей крыс *in vivo*, тест толерантности к физическим нагрузкам «рота-род», иммуноцито- и иммуногистохимическое окрашивание клеток и тканей, морфометрические методы, световая, флуоресцентная и конфокальная микроскопия, статистический анализ.

Степень обоснованности результатов исследования не вызывает сомнений. Сформулированные автором выводы достоверны и логически

следуют из результатов, полученных в ходе исследования.

Результаты, полученные в ходе исследования, были представлены на Всероссийских научных конференциях и Национальном Конгрессе по регенеративной медицине.

Значимость для науки и практики полученных автором результатов

Полученные автором результаты, характеризующие фенотипические и функциональные свойства МСК *in vitro* и *in vivo*, расширяют систему наших фундаментальных знаний о биологии мезенхимных клетках, полученных из разных органов и тканей человека и животных.

Полученные данные могут быть использованы для разработки новых методов клеточной терапии для стимуляции восстановления кровоснабжения в ишемизированных тканях.

Обнаруженное на моделях *in vitro* VEGF-A-независимое стимулирующее действие МСК на эндотелиальные клетки может в дальнейшем быть использовано для трансплантации МСК пациентам, не отвечающим на VEGF-A-опосредованную терапию.

Полученные данные о динамике элиминации аллогенных МСК иммунной системой реципиента после внутримышечного введения могут быть учтены при разработке клинических протоколов клеточной терапии для лечения ишемии нижних конечностей.

Полученные в диссертационной работе данные особенно актуальны в связи с принятием закона РФ, регулирующего использование клеточных технологий в медицине.

Конкретные рекомендации по использованию результатов и выводов работы

На основании полученных данных о динамике элиминации аллогенных МСК из пупочного канатика иммунной системой реципиента после внутримышечного введения следует с осторожностью относиться к режиму введения этих клеток и при разработке протоколов их использования для лечения ишемии нижних конечностей.

VEGF-А-независимое стимулирующее действие МСК на эндотелиальные клетки, обнаруженное в модельных экспериментах *in vitro*, может быть использовано при разработке протоколов клинических исследований трансплантации МСК пациентам, не отвечающим на VEGF-А-опосредованную терапию.

Структура диссертации традиционная. Диссертация хорошо оформлена, не содержит фактических ошибок, написана хорошим научным языком, иллюстрирована рисунками высокого качества.

Диссертация изложена на 169 страницах и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов, обсуждения результатов, заключения, выводов и списка литературы, включающего 236 российских и зарубежных источников. Работа иллюстрирована 53 рисунками и 5 таблицами.

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

По материалам диссертационной работы опубликовано 16 научных работ, из них 8 статей в рецензируемых научных изданиях, входящих в перечень ВАК.

Принципиальных замечаний по представленной работе нет.

Однако к диссертационной работе имеется ряд замечаний и вопросов, требующих уточнения:

1. В работе не содержится данных (ни собственных, ни данных литературы), на основании которых был сделан выбор концентрации VEGF и блокирующих антител к VEGF в экспериментах *in vitro*, в которых автор анализировал влияние кондиционированной среды МСК на пролиферацию и дифференцировку эндотелиальных клеток.
2. В работу не включены ссылки на данные литературы, на основании которых автором был сделан выбор пары антител к CD68 и CD206 для выявления активированных макрофагов.

3. В Таблице 4 (в разделе обзор литературы), в которой приводятся данные о клинических исследованиях применения аллогенных МСК пупочного канатика для терапии ишемических повреждений ткани, следовало бы указать год проведения каждого исследования.

4. Отмечается неточность формулировки "поляризация макрофагов", необходимо пояснение в тексте диссертации, объясняющее, что конкретно автор имеет в виду.

5. На странице 118 абзац «Еще одним спорным вопросом является незаменимость использования VEGF-A165 в качестве основного индуктора, т.к. показано, что на поверхности МСК не экспрессируются рецепторы к VEGF, а воздействие его опосредовано связыванием с PDGF-рецепторами [Ball et al., 2007].». Данное высказывание не совсем понятно и нуждается в дополнительном пояснении.

6. В обзор литературы при изложении известных данных об иммуномодулирующих свойствах и иммунопривилегированном статусе МСК пупочного канатика рекомендуется включить известные данные об этих свойствах МСК, полученных из других органов и тканей.

Представленные замечания несущественны и не умаляют достоинства и значимости работы.

Заключение

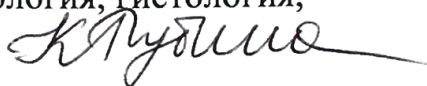
Диссертационная работа Арутюнян И.В. «Ангиогенные свойства мультипотентных стромальных клеток пупочного канатика» является научно-квалификационной работой, представляет собой самостоятельное и логически завершенное научное исследование, посвящено решению актуальной научной задачи, а именно изучению механизмов реализации ангиогенной активности мультипотентных стромальных клеток пупочного канатика.

Результаты диссертационного исследования имеют большое научно-практическое значение для клеточной биологии, цитологии, гистологии,

клеточной трансплантологии и регенеративной медицины.

По актуальности, новизне, теоретической и практической значимости, достоверности полученных результатов работа Арутюнян И.В. соответствует требованиям п.п. 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 кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология. Автор заслуживает присвоения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология.

Старший научный сотрудник
НИЛ лаборатории постгеномных технологий в медицине,
факультета фундаментальной медицины
ФГБОУ ВО «МГУ имени М.В. Ломоносова»,
доктор биологических наук по специальности
03.03.04. – клеточная биология, цитология, гистология,
доцент



Рубина К.А.

Ученый секретарь
факультета фундаментальной медицины
ФГБОУ ВО «МГУ имени М.В. Ломоносова»,
к.м.н.,



Акопян Ж.А.