

## **ОТЗЫВ ОППОНЕНТА**

на диссертацию Сотниченко Александра Сергеевича

**«Морфологическая характеристика каркаса тканеинженерного сердца и его взаимодействия со стволовыми клетками»**,

представленную к защите на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

### **Актуальность**

Диссертационное исследование посвящено актуальной тематике, обоснованию и разработке технологических подходов тканевой инженерии целых органов, в частности, сердца. Как известно, проблема органной трансплантации в связи с дефицитом донорских органов никогда не будет решена. В тоже время органные трансплантации при ряде тяжелых заболеваний, например, при хронической сердечной недостаточности, являются единственным эффективным способом лечения. В связи с этим необходимо искать альтернативные источники донорских тканей и органов. Одним из перспективных методов решения данной проблемы является тканевая инженерия. На фоне последних достижений в области биоматериаловедения и клеточных технологий это направление чрезвычайно бурно развивается в последние годы. Однако в этой области очень много нерешенных проблем, связанных с выбором материала скаффолда, получением и заселением клеточных культур, васкуляризации полученных ТИК и многие другие. В последнее время, кроме исследований по созданию синтетических скаффолдов, уделяется много внимания развитию технологии децеллюляризации тканей и целых органов. Принято считать, что избавившись от клеток ткань теряет иммуногенность и ее можно использовать для алло- и даже ксено-трансплантации. При этом ацеллюлярные ткани имеют нативную структуру экстрацеллюлярного матрикса, прежде всего, сохраняются коллагеновые волокна, в меньшей степени аморфное межклеточное вещество и даже сигнальные молекулы. Все существующие на сегодняшний день протоколы децеллюляризации заключаются в длительной инкубации в детергентных и ферментных растворах, и отличаются друг от друга лишь составом и временем

инкубации. Критерием эффективности децеллюляризации являются (1) отсутствие ядер при окрашивании гематоксилином и эозином и DAPI и (2) низкое содержание короткоцепочечной ДНК. При этом очевидно, что максимальной иммуногенностью обладают мембранные и внутриклеточные белки, содержание которых чаще всего не оценивается. Кроме того, процесс децеллюляризации в зависимости от агрессивности сред и времени инкубации может существенно менять структуру экстрацеллюлярного матрикса и его биомеханические свойства, что тоже необходимо учитывать. Поэтому актуальным представляется разработка алгоритма более детальной характеристики ацеллюлярной ткани или органа, разработки критериев оценки качества для использования в тканевой инженерии.

В диссертационной работе Сотниченко А.С. разработан более короткий по времени, а потому более щадящий в отношении структурных белков экстрацеллюлярного матрикса протокол. В децеллюляризованном (ДЦ) сердце крысы качественно и количественно изучили содержание белков внеклеточного матрикса и некоторых факторов роста (коллаген I и IV типов, ламинин, эластин, фибронектин, VEGF), не обладающих видовой специфичностью и антигенной активностью, но играющих ключевое значение в кондуктивных и морфогенетических свойствах матрикса. Также были изучены внутриклеточные сократительные белки (тропомиозин, десмин), МНС I типа (поверхностный маркер всех соматических клеток), фактор фон Виллебранта (маркер эндотелия), элементы внутриклеточной антиоксидантной системы, ДНК, которые обладают высокой антигенностью. Содержание последних существенно снижалась после децеллюляризации по разработанному автором протоколу. На следующем этапе автором была отработана процедура эффективного заселения (репопуляции) ацеллюлярного сердца культурами мультипотентных стромальных клеток (МСК). Таким образом, автор предложил эффективный протокол децеллюляризации целого сердца крысы, более развернутый и обоснованный алгоритм оценки качества децеллюляризации ткани и эффективный способ ее репопуляции МСК.

## Научная новизна

Сердце крыс многие исследователи подвергали децеллюляризации с последующим заселением клеток. Описано множество протоколов децеллюляризации, где используют различные критерии оценки эффективности этой процедуры. Универсального протокола для разных тканей не существует, и, видимо, не может быть. Но главная проблема в данной области науки – отсутствие единых критериев оценки эффективности процедуры децеллюляризации, в настоящее время активно ведется эмпирический поиск и разработка наиболее эффективных подходов.

Автором разработан оптимизированный, более кратковременный и щадящий детергент-энзиматический протокол децеллюляризации сердца крысы, что позволяет максимально эффективно сохранить гистологическую структуру внеклеточного матрикса сердца, его структурные белки (коллаген I и IV типа, ламинин, фибронектин, эластин), и даже факторы роста (VEGF), и в тоже время элиминировать внутриклеточные и мембранные молекулы-антигены (ДНК, МНС I типа, фактор Виллебранда, тропомиозин, десмин). Это обеспечивается снижением концентрации и временем экспозиции ферментов и детергентов до 28 часов. Кроме того, предложенный протокол снижает частоту бактериальной контаминации получаемого каркаса. Полученные качественные и количественные данные о составе волокон и аморфного компонента экстрацеллюлярного матрикса после децеллюляризации позволили определить наиболее релевантные критерии оценки эффективности этой процедуры, что имеет большое практическое значение.

Новым в работе является попытка заселить полученный матрикс органа МСК, как возможных клеток предшественников эндотелия, гладких миоцитов и кардиомиоцитов. Подобран эффективный способ репопуляции ацеллюлярного матрикса клетками путем перфузии суспензии клеток через сохранившийся каркас нативных кровеносных сосудов. Продемонстрирована выживаемость, распределение, пролиферация МСК в децеллюляризованном каркасе сердца крысы после их интравазального введения, показана экспрессия маркеров эндотелиальной и кардиомиоцитарной дифференцировки трансплантированными

клетками. Но нужно понимать, что показана экспрессия только маркеров, а не эндотелий в составе сосудистой стенки и не кардиомиоцит с характерной морфологией и функциями.

### **Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации**

Обращает на себя внимание большое количество современных методов исследования, использованных автором для доказательства основных положений работы. Можно утверждать, что использован достаточный арсенал качественных и количественных методов оценки эффективности децеллюляризации и последующей репопуляции миокарда. Проводили рутинный гистологический анализ, сканирующую электронную микроскопию, иммуногистохимическое исследование с использованием антител к основным компонентам экстрацеллюлярного матрикса, определяли количество сохранившейся длинноцепочечной ДНК, оценивали основные биомеханические свойства матрикса, а также цитотоксичность полученного скаффолда в отношении к МСК, засеянных на него. В работе используется множество морфометрических показателей, характеризующих состав децеллюляризованного миокарда, которые позволили объективизировать полученные результаты. Используются адекватные методы статистического анализа полученных данных.

В целом, высокий методический уровень проведенных исследований, высочайший уровень публикаций автора, адекватный набор методов качественного и количественной оценки изучаемых воздействий на нативный, а потом децеллюляризованный миокард делают полученные результаты и выводы вполне обоснованными и доказательными

### **Значимость для науки и практической медицины полученных автором результатов**

Полученные данные расширили наше понимание процесса децеллюляризации тканей и сердца. Предложен более кратковременный и щадящий детергент-энзиматический протокол децеллюляризации тканей сердца,

который позволяет сохранить исходную гистологическую структуру внеклеточного матрикса сердца, его структурные и даже регуляторные белки и пептиды. Разработанный протокол позволяет снизить концентрацию и время экспозиции ферментов и детергентов. Это, в свою очередь, снижает частоту бактериальной контаминации получаемого каркаса. Полученные качественные и количественные данные о составе волокон и аморфного компонента экстрацеллюлярного матрикса после децеллюляризации позволили определить наиболее релевантные критерии оценки эффективности этой процедуры, что имеет большое практическое значение. Предложен способ эффективной рецеллюляризации внеклеточного матрикса с использованием МСК. Все это создает основу для дальнейших разработок в области тканевой инженерии сердца и других органов. На текущем этапе развития технологий в этой области говорить о клинической значимости полученных результатов преждевременно. Сложно экстраполировать результаты, полученные на мелких лабораторных животных на человеческое сердце. Так как размер объекта не позволяет решить основную проблему тканевой инженерии органов, васкуляризацию.

Диссертация построена по традиционной схеме оформления научных публикаций и состоит из введения, литературного обзора, материалов и методов, собственных результатов и их обсуждения. Оформление и объем диссертации соответствует предъявляемым к кандидатским диссертациям требованиям. Диссертация изложена на 124 машинописных страницах, содержит 4 таблицы, 24 рисунка. Работа состоит из введения, 4 глав, выводов, указателя использованной литературы и приложений. Библиография включает 205 источников из них 55 на русском языке и 150 – на иностранных языках.

В автореферате и опубликованных работах отражены основные положения диссертации. По материалам работы опубликовано 15 печатных работы, в том числе, 5 в журналах, рекомендованных ВАК РФ, имеется 1 патент на изобретение.

Выводы основаны на большом фактическом материале и логично вытекают из результатов, полученных лично автором.

Однако имеется несколько замечаний и вопросов к диссертационной работе:

1. Какие из критериев оценки эффективности/качества децеллюляризации являются наиболее чувствительным и специфичным для оценки децеллюляризации сердца?
2. Были ли у трансплантированных клеток, выявленных в ДЦ миокарде морфологические и функциональные признаки рабочих кардиомиоцитов?
3. Для количественной оценки состава экстрацеллюлярного матрикса более оправдано использовать вестерн-блот, а не иммуногистохимическое исследование на срезах, что позволяет судить больше о локализации, а не о количестве.
4. Экспрессия гладкомышечного актина не может свидетельствовать о кардиомиоцитарной дифференцировке, так как МСК сами могут экспрессировать ГМА или дифференцироваться в гладкие миоциты или миофибробласты.

Представленные замечания не носят принципиального характера и не умаляют значимости и ценности данной работы

### **Заключение**

Диссертация Сотниченко А.С. на тему «Морфологическая характеристика каркаса тканеинженерного сердца и его взаимодействия со стволовыми клетками», выполненная под руководством доктор биологических наук профессора А.А. Славинского, представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология, является научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований решена актуальная научная задача разработки эффективного протокола децеллюляризации целого сердца с последующей комплексной характеристикой структуры и состава тканей сердца. Показана принципиальная возможность последующей репопуляции тканей культурой МСК. Результаты диссертационного исследования имеют большое



теоретическое и практическое значение для гистологии, клеточной биологии, трансплантологии и тканевой инженерии.

По своей актуальности темы, научной новизне, объёму проведённых экспериментальных исследований, научно-методическому уровню, научной новизне, обоснованности выводов и практических рекомендаций диссертация полностью соответствует требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения учёных степеней», утверждённого Постановлением Правительства РФ №842 от 24.09.2013 г., предъявляемым к кандидатским диссертациям, а её автор, Сотниченко А.С. заслуживает присуждения учёной степени кандидата медицинских наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология.

Доктор медицинских наук  
по специальности 03.03.04  
клеточная биология, цитология, гистология,  
заведующий лабораторией  
регенеративной медицины  
ФГБУ «Научный центр акушерства,  
гинекологии и перинатологии  
им. Акад. В.И. Кулакова» Минздрава России  
117997, г. Москва, ул. Академика Опарина, д. 4.  
Телефон: +7(495) 531-4444  
Электронная почта: secretariat@oparina4.ru  
Подпись д.м.н. Т.Х. Фатхудинова заверяю:  
Ученый секретарь ФГБУ «Научный центр акушерства,  
гинекологии и перинатологии им. акад. В.И. Кулакова» Минздрава России, к.м.н.,  
доцент

**Фатхудинов Т. Х.**



12.05.2016

**Павлович С.В.**