



МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО
ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ

АЛТАЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
(ГБОУ ВПО АГМУ
Минздрава России)

656038, г. Барнаул, пр. Ленина, 40.

Тел.(3852) 368848, факс (3852) 366091

E-mail: rector@agmu.ru; <http://www.agmu.ru>

ОКПО 01962853, ОГРН 1022201762164;

ИНН 2225003156, КПП 222501001

УТВЕРЖДАЮ:

Ректор

ГБОУ ВПО АГМУ Минздрава России

д. м. н., профессор



Салдан Игорь Петрович

« 14 » ноября 2014 г.

« 17 » 11 2014 г. № 1448

ОТЗЫВ

ведущей организации о научной и практической ценности диссертационной работы Повещенко Ольги Владимировны: «Морфофункциональные характеристики субпопуляций мобилизованных из костного мозга мононуклеарных клеток крови при хронической сердечной недостаточности», представленной на соискание учёной степени доктора медицинских наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Актуальность исследования. Диссертация Ольги Владимировны Повещенко посвящена актуальной проблеме современной медицинской науки – исследованию морфофункциональных особенностей мононуклеарных клеток, мобилизованных из костного мозга, с целью стимуляции неоваскуляризации миокарда при хронической сердечной недостаточности. Развитие и использование клеточных технологий является одним из приоритетных направлений современной медицинской науки. Эндотелиальные прогениторные клетки (ЭПК) представляют собой уникальную популяцию клеток, которые, как и эмбриональные ангиобласты, способствуют формированию сосудов в постнатальном периоде, как за счет ангиогенеза, так и путем васкулогенеза, когда в ответ на ангиогенные ростовые факторы ЭПК мигрируют из ниши костного мозга в

кровеносное русло, циркулируют и трансформируются в тканях в локальные адгезивные ЭПК

Изменения в количественном содержании и функциональной активности ЭПК выявлены при многих заболеваниях. При этом снижение пролиферации, миграции ЭПК в очаг повреждения, изменение секреторной активности рассматривается в качестве возможного механизма развития ишемической болезни сердца (ИБС) и хронической сердечной недостаточности (ХСН)

Участие ЭПК в неоваскуляризации обусловлено не только их дифференцировкой в эндотелиальные клетки, но и их способностью продуцировать различные регуляторные ростовые факторы и цитокины, стимулирующие ангиогенез

Быстрое развитие клинического эффекта и очень низкое количество интегрированных в зоне повреждения ЭПК предполагает паракринные эффекты этих клеток.

Свойства этих клеток, такие, как спектр и уровень продуцируемых ЭПК цитокинов, экспрессия поверхностных молекул и способность активировать различные этапы ангиогенеза, охарактеризованы недостаточно. Практически отсутствуют сравнительные данные о спектре секретируемых цитокинов циркулирующими ЭПК и выращенными *in vitro* в культуре ЭПК у пациентов с ХСН. Малоисследованным остается также вопрос, насколько эффективно может происходить мобилизация ЭПК из костного мозга у пациентов с ХСН и изменяется ли их функциональная активность при введении G-CSF. Наконец, большой интерес представляет связь морфофункциональных показателей ЭПК с параметрами функционального состояния ишемизированного миокарда.

Таким образом, способность эндотелиальных прогениторных клеток поддерживать постнатальный васкулогенез и ангиогенез находит все более широкое применение в новейших терапевтических технологиях. Несмотря на вышеизложенное, механизмы взаимодействий ЭПК клеток и эндотелиальных клеток имеющейся сосудистой сети изучены недостаточно

Актуальность темы диссертационного исследования, его цель и задачи не вызывают сомнения.

Обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций, их достоверность и новизна. Научные положения и выводы диссертации Повещенко О. В. основаны на достаточном для решения поставленных задач объеме материала.

Для сбора и обработки исходной информации использованы современные методы: мобилизация мононуклеарных клеток крови из костного мозга путем введения

рекомбинантного человеческого гранулоцитарного колониестимулирующего фактора, аппаратный цитаферез, проточная цитометрия (фенотипирование клеток, исследование клеточного цикла и апоптоза), иммуноцитохимическое исследование, световая микроскопия, спектрофотометрия, получение культур клеток, иммуноферментный анализ (определение концентрации цитокинов в кондиционных средах), исследование пролиферативной активности и миграционной способности клеток с использованием аппаратов xCELLigence System и Cell-IQ. Для обработки количественных показателей использованы адекватные методы статистического анализа. Работа иллюстрирована рисунками, таблицами, фотографиями высокого качества.

Результаты исследования тщательно проанализированы и обсуждены с привлечением современной зарубежной и отечественной литературы. Все положения и выводы основаны на фактах, полученных лично автором. Основные результаты диссертации опубликованы в 41 научном труде, из них 17 статей в журналах, рекомендованных ВАК РФ. Результаты были доложены на международных научных конференциях различного уровня. Таким образом, достоверность и обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертационной работе Повещенко О. В., сомнений не вызывают.

Практические рекомендации, сформулированные в диссертации, обоснованы проведенными исследованиями и должны служить руководством в работе широкого круга специалистов: клеточных биологов, кардиологов.

Работа выполнена в лаборатории клеточных технологий Института клинической и экспериментальной лимфологии и на базе центра хирургической аритмологии Института патологии кровообращения им. ак. Е. Н. Мешалкина. Полученные результаты являются новыми, обоснованными и имеют большое научное и практическое значение.

Научная и практическая ценность. Настоящая работа является обобщающим научным исследованием. Новизна полученных в диссертационной работе результатов не вызывает сомнений. Так, впервые установлено, что из костного мозга больных с тяжелой формой хронической сердечной недостаточности можно мобилизовать в периферическую кровь функционально активные эндотелиальные прогениторные клетки путем введения гранулоцитарного колониестимулирующего фактора. Впервые установлена эффективность мобилизации ЭПК из костного мозга в периферическую кровь у пациентов с тяжелой формой хронической сердечной недостаточности (ХСН). Проведено комплексное исследование фенотипа и функциональной активности ЭПК, мобилизованных введением G-CSF, у пациентов с ХСН. Показана гетерогенность популяций, находящихся на разных стадиях дифференцировки.

Впервые изучена пролиферативная активность мононуклеарных клеток (МНК) пациентов с ХСН, способность к миграции *in vitro*, установлен спектр секретируемых биологически активных веществ до и после мобилизации G-CSF. Показано, что после курса мобилизации G-CSF происходит увеличение пролиферативного потенциала мононуклеаров пациентов с ХСН на различные митогенные и цитокиновые стимулы (Кон А, Еро, G-CSF), увеличение количества колониеобразующих единиц и экспрессии рецептора хоуминга CXCR₄ на CD34⁺ ЭПК. Дополнено, что культивируемые МНК пациентов секретируют цитокины с регуляторными, в том числе и ангиогенными свойствами, такие как IL-10, IL-18, IL-8, Еро, VEGF, TNF- α , G-CSF. Выявлена взаимосвязь циркулирующих ЭПК различной степени дифференцировки и продукции цитокинов и ростовых факторов МНК пациентов с ХСН.

Впервые получены ЭПК *in vitro* при культивировании МНК пациентов с ХСН после мобилизации. Показано, что культивируемые в «ранние» и «поздние» сроки ЭПК пациентов с ХСН обладают различной пролиферативной и секреторной активностью. Показано, что «ранние» эндотелиальные прогениторные клетки секретируют более высокий уровень IL-10, IL-18, IL-8, Еро, VEGF, TNF- α и NO. Продemonстрировано, что белки внеклеточного матрикса оказывают влияние на уровень секретируемых биологически активных веществ ЭПК при культивировании.

Впервые показано, что эндотелиальные прогениторные клетки пациентов и зрелые эндотелиальные клетки клеточной линии EA.hy926 взаимовлияют на функциональное состояние друг друга. Исследование пролиферативного и миграционного потенциала клеток под влиянием растворимых секреторных продуктов позволило получить новые данные о паракринных механизмах взаимовлияния различной степени дифференцировки эндотелиальных клеток. Кондиционная среда, полученная при культивировании клеток, содержит проангиогенные факторы, которые обуславливают функциональный потенциал как недифференцированных, так и зрелых эндотелиальных клеток.

Оценена взаимосвязь морфофункциональных показателей МНК пациентов с ХСН после мобилизации G-CSF с показателями функционального состояния миокарда в отдаленные сроки после интрамиокардиального введения клеточного трансплантата (через 6 и 12 месяцев). Впервые показана вовлеченность различных эндотелиальных прогениторных клеток и секретируемых цитокинов в процесс регенерации ишемизированного миокарда у пациентов с ХСН.

Полученные результаты являются новыми, обоснованными и имеют большое научное и практическое значение.

Значимость полученных результатов для медицинской науки и клинической практики. Автором на основании результатов исследования обоснована возможность и необходимость мобилизации в периферическую кровь функционально активных эндотелиальных прогениторных клеток костного мозга больных с тяжелой формой хронической сердечной недостаточности путем введения гранулоцитарного колониестимулирующего фактора. Получены новые знания, расширяющие современные представления о клеточных механизмах постнатального васкуло- и ангиогенеза. Существенно дополнены фенотипические и функциональные характеристики эндотелиальных прогениторных клеток. Большой интерес представляют установленные автором закономерности паракринных влияний между недифференцированными и зрелыми эндотелиальными клетками. Результаты комплексного изучения фенотипов и функциональных свойств как циркулирующих, так и полученных при культивировании ЭПК пациентов с ХСН, расширяют представления о морфофункциональных свойствах СПК и ЭПК, в том числе как источника применения в практической медицине.

Полученные данные о спектре секретируемых проангиогенных молекул циркулирующими и культивируемыми ЭПК, а также их связь с функциональными свойствами эндотелиальных клеток, дополняют имеющиеся знания о паракринных и аутокринных взаимодействиях различной степени зрелости эндотелиальных клеток.

Проведенные исследования позволили получить новые данные о паракринных воздействиях ЭПК и эндотелиальных клеток на примере клеточной линии EA. hu926, что раскрывает закономерности взаимовлияния недифференцированных и зрелых эндотелиальных клеток, и имеет большое теоретическое значение.

Выявленное влияние условий и сроков культивирования на уровень секреторной активности ЭПК пациентов с ХСН акцентирует внимание на том, что культивируемые в «ранние» сроки ЭПК способны проявлять паракринное действие, что необходимо учитывать при разработке методов трансплантации СПК и оценке результатов при их введении.

Оценка эффективности влияния G-CSF на мобилизацию ЭПК из костного мозга у пациентов с ХСН и свойства клеток после мобилизации являются научной основой для оценки функциональных возможностей клеточного трансплантата для введения пациентам.

Чрезвычайно важными, как с теоретической, так и с практической точки зрения является анализ связи показателей содержания в периферической крови пула клеток с прогениторной активностью и продукции цитокинов МНК мобилизованными G-CSF у

пациентов с ХСН, с функциональными параметрами клинической эффективности при интрамиокардиальном введении МНК.

Результаты работы позволяют повысить эффективность лечения пациентов с ХСН.

Совокупность полученных результатов исследования может явиться теоретической основой для дальнейших экспериментальных и клинических исследований, необходимых для разработки новых репаративных подходов в области клеточной терапии ХСН.

Результаты исследования представляют теоретическое обоснование для использования клеточной терапии с целью улучшения васкуляризации и функционального состояния миокарда у пациентов с тяжелой формой хронической сердечной недостаточности.

Результаты диссертационной работы представляют интерес для клеточной биологии, цитологии, гистологии, патологической физиологии, кардиологии, терапии и могут быть использованы в преподавании соответствующих дисциплин в медицинских высших учебных заведениях.

Конкретные рекомендации по использованию результатов и выводов, приведенных в диссертации. Диссертационная работа Повещенко Ольги Владимировны является законченным научным исследованием. Диссертация написана в традиционном стиле и состоит из введения, обзора литературы, описания материала и методов исследования, 4 глав собственных исследований, обсуждения полученных результатов, заключения и выводов. Работа изложена на 228 страницах машинописного текста, включает 34 рисунка, 18 таблиц и 1 схему. Список цитируемой литературы состоит из 386 источников, из них 353 иностранных.

Работа хорошо иллюстрирована, отличается ясностью и логичностью изложения, хорошим литературным языком. Обширный иллюстративный материал корректная статистическая обработка убедительно доказывают достоверность полученных результатов и точность сделанных выводов.

По материалам диссертации опубликована 41 научная работа, 17 статей в ведущих рецензируемых научных журналах, рекомендуемых для публикаций основных результатов исследования.

Работа выполнена на основании анализа результатов. Методики исследования современны и разнообразны.

Результаты работы корректно оформлены, верифицированы при помощи современных методов статистического анализа, что вместе с достаточным объемом

клинического материала позволяет считать полученные результаты и их трактовку убедительными. Сформулированные на основе полученных результатов выводы логичны, обоснованы и подтверждены достаточным объемом выполненных исследований.

Научные положения и результаты диссертации имеют высокую степень достоверности и аргументации. Обоснованность научных положений, сформулированных в диссертации, подтверждается соответствующим объемом исследований.

Практические рекомендации, сформулированные в диссертации, обоснованы, внедрены в учебный процесс и научную работу кафедры терапии, гематологии и трансфузиологии ФПК и ППВ Новосибирского государственного медицинского университета.

Основные положения диссертации доложены и обсуждены на конференциях различного уровня (городских, межрегиональных, в том числе с международным участием).

Весь материал, представленный в диссертации, получен, обработан, проанализирован автором лично. Самостоятельно проведены сравнительный анализ, интерпретация и статистическая обработка полученных данных, на основании которых были сделаны выводы по проведенной работе и сформулированы практические рекомендации.

Основные этапы работы, выводы и результаты представлены в автореферате. Автореферат соответствует содержанию диссертации.

Принципиальных замечаний по работе нет.

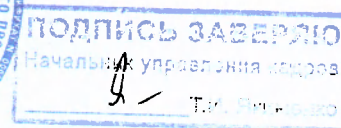
Заключение. Диссертационная работа Повещенко Ольги Владимировны «Морфофункциональные характеристики субпопуляций мобилизованных из костного мозга мононуклеарных клеток крови при хронической сердечной недостаточности», представленная на соискание учёной степени доктора медицинских наук, является законченной научной квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором фундаментальных исследований разработаны теоретические положения о механизмах постнатального васкулогенеза и ангиогенеза, опосредованных эндотелиальными прогениторными клетками, в условиях хронической сердечной недостаточности, проведено теоретическое обоснование нового метода стимуляции васкуляризации и регенерации миокарда у больных с хронической сердечной недостаточностью, что в совокупности можно квалифицировать как научное достижение в области клеточных регенеративных технологий.

По актуальности, научной и практической значимости работа полностью соответствует всем требованиям пункта 9 Положения о присуждении ученых степеней (постановление Правительства РФ от 24.09.2013 № 842), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология, а ее автор, Повещенко Ольга Владимировна, заслуживает присуждения искомой степени доктора медицинских наук.

Отзыв обсужден и одобрен на заседании кафедры гистологии ГБОУ ВПО «Алтайский государственный медицинский университет» Минздрава России 7 ноября 2014 года, протокол кафедрального заседания № 69.

Заведующий кафедрой гистологии,
доктор медицинских наук (03.03.04 – клеточная
биология, цитология, гистология), профессор

Талалаев Сергей Владимирович



Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Алтайский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Барнаул)

Адрес: 656038, РФ, Алтайский край, г. Барнаул, проспект Ленина, д. 40,
ул. Папанинцев, д. 126, учебный корпус № 4.

Телефон: (3852) 241-971

E-mail: histology@agmu.ru