

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора медицинских наук Обуховой Л. А.
на диссертацию **Повещенко О. В.** на тему: **«Морфофункциональные характеристики субпопуляций мобилизованных из костного мозга мононуклеарных клеток крови при хронической сердечной недостаточности»**, представленную на соискание учёной степени **доктора медицинских наук** по специальности **03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология**

Диссертация «Морфофункциональные характеристики субпопуляций мобилизованных из костного мозга мононуклеарных клеток крови при хронической сердечной недостаточности» 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. Способность эндотелиальных прогениторных клеток поддерживать постнатальный васкулогенез и ангиогенез находит все более широкое применение в новейших терапевтических технологиях. Область исследований эндотелиальных прогениторных клеток является относительно новой и требует дополнительных исследований. Поскольку для этих клеток нет специфических уникальных маркеров, существуют проблемы их идентификации, фенотипирования и выстраивания иерархии субпопуляций. Недостаточно ясны механизмы взаимодействий эндотелиальных прогениторных клеток и эндотелиальных клеток имеющейся сосудистой сети. Отсутствует «золотой стандарт» оценки конечного результата ангиогенной активности эндотелиальных прогениторных клеток, в частности, паракринных влияний, так как множество регуляторных молекул может одновременно производить множество эффектов; отсутствуют сколько-нибудь определенные данные о судьбе этих клеток. В настоящее время нет способов точной оценки ангиогенного статуса больных людей, так как он сильно варьирует в зависимости от пола, возраста, органа, ткани, заболевания, лечения. Диссертационная работа посвящена исследованию морфофункциональных свойств эндотелиальных прогениторных клеток у пациентов с хронической сердечной недостаточностью и обоснованию их использования в лечении сердечнососудистых заболеваний, поэтому ее актуальность сомнений не вызывает.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, их достоверность и новизна. Научные положения и выводы диссертации основаны на достаточном для решения поставленных задач объеме материала. В работе использованы мононуклеарные клетки периферической крови от 77 пациентов с хронической сердечной недостаточностью и клетки эндотелиальной линии EA.hy926. Исследования проведены с соблюдением этических норм и правил работы с кровью человека и культурами клеток. Получение клеток крови и последующее их применение для лечения пациентов проводилось в Новосибирском научно-исследовательском институте патологии кровообращения имени академика Е. Н. Мешалкина.

Для сбора и обработки исходной информации использованы современные методы: мобилизация мононуклеарных клеток крови из костного мозга путем пятикратного 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 диаграммами, гистограммами, графиками, морфологические изменения документированы микрофотографиями хорошего качества, количественные данные представлены в 18 таблицах.

Идея работы основана на современных представлениях о васкуло- и ангиогенезе и о роли в этих процессах эндотелиальных прогениторных клеток. 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 14 статей в ведущих рецензируемых научных журналах, рекомендуемых для публикаций основных результатов исследования. Результаты были доложены на международных научных конференциях различного уровня. Таким образом, достоверность и обоснованность

научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертационной работе, сомнений не вызывают.

Результаты исследования Повещенко О. В. являются **новыми**. 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.

Параллельные исследования фенотипа и функциональной активности клеток показали, что мобилизованные из костного мозга клетки представлены несколькими субпопуляциями, находящимися на разных стадиях дифференцировки и обладающими различными функциональными характеристиками.

Доказано, что стимуляция гранулоцитарным колониестимулирующим фактором приводит к усилению спонтанной и стимулированной пролиферативной активности мононуклеарных клеток и способности их к миграции.

Впервые установлено, что мононуклеарные клетки пациентов с хронической сердечной недостаточностью способны при культивировании дифференцироваться в эндотелиальные прогениторные клетки и продуцировать цитокины с ангиогенными свойствами. Результаты проведенного исследования дополнили имеющиеся знания о спектре цитокинов, продуцируемых эндотелиальными прогениторными клетками различной степени дифференцировки.

Выявлено влияние различных белков внеклеточного матрикса на уровень продукции цитокинов. Выявлены закономерности взаимных паракринных влияний недифференцированных и зрелых эндотелиальных клеток на функциональные показатели друг друга. Впервые получены положительные терапевтические эффекты интрамиокардиального введения аутологичных мононуклеарных клеток крови, обогащенных эндотелиальными прогениторными клетками, у пациентов с хронической сердечной недостаточностью.

Результаты исследования Повещенко О. В. являются **значимыми для медицинской науки, исследовательской и клинической практики**. 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 исследования представляют теоретическое обоснование для использования клеточной терапии с целью улучшения васкуляризации и функционального состояния миокарда у пациентов с тяжелой формой хронической сердечной недостаточности. Особую ценность с практической точки зрения имеют доказательства существования собственных ангиогенных резервов у данной категории больных.

Результаты диссертационной работы Повещенко О. В. представляют интерес для клеточной биологии, цитологии, гистологии, патологической физиологии, кардиологии, терапии и должны быть включены в лекционные курсы соответствующих дисциплин в медицинских высших учебных заведениях.

Диссертационная работа содержит все необходимые разделы: введение, обзор литературы, собственные исследования, включая главы: «Материал и методы исследования», «Результаты собственных исследований», «Обсуждение результатов исследования», заключение, выводы, практические рекомендации, список литературы, список сокращенных терминов, список иллюстраций.

Во введении, в разделе «Актуальность проблемы» обозначены все основные аспекты изучаемой проблемы: обобщены известные данные об эндотелиальных прогениторных клетках и их способности индуцировать васкулогенез у взрослых людей, отмечено наличие снижения количества и функциональной активности этих клеток при развитии ишемической болезни сердца и хронической сердечной недостаточности, дана характеристика доступных источников аутологичных эндотелиальных прогениторных клеток у человека и способов исправления нарушенных функций этих клеток при развитии заболеваний, обобщены результаты клинических апробаций, при этом обращено внимание на недостаточную изученность их морфологических и функциональных характеристик, что и послужило поводом для настоящего исследования.

Цель и задачи. Цель исследования сформулирована четко, соответствует теме и заявленной специальности, замечаний к ней нет. Задачи соответствуют цели и полностью раскрывают ее, сформулированы кратко и логично. Раздел **«Новизна исследования»** написан исчерпывающе. Автор корректно выделяет все новые факты, полученные в данном исследовании.

Раздел **«Теоретическое и практическое значение результатов исследования»** также написан достаточно полно и корректно. Проведенное исследование расширило представления о происхождении, дифференцировке, пролиферации, миграции и секреторной активности, изученных клеток, то есть о

большинстве фундаментальных процессов в жизненном цикле эндотелиальных прогениторных клеток (за исключением их судьбы).

В диссертации **4 положения, выносимые на защиту**, они хорошо сформулированы, содержат все принципиально важные новые результаты, полученные в данном исследовании, замечаний к ним нет.

Обзор литературы написан по существу, грамотно, детально и в то же время лаконично. Список литературы содержит 386 источников, из них 353 зарубежных, 33 – отечественных авторов. Литература современная – 40 % статей за последние 5 лет; обзор литературы является одним из достоинств работы.

«Материал и методы исследования». Четко представлен дизайн исследования. Имеются ссылки на заключения этических комитетов по месту выполнения работы. Последовательно и квалифицированно описаны все методы исследования, этапы сбора первичной информации и ее статистической обработки – проводилась проверка характера распределения количественных показателей, статистические критерии использованы обоснованно, в соответствии с типом данных. Высокий методический уровень, безусловно, является достоинством данной работы.

Главы результатов собственного исследования. В первой главе результатов собственного исследования автор убедительно доказывает, что в костном мозге больных с тяжелой формой хронической сердечной недостаточности существует резерв эндотелиальных прогениторных клеток. Введение гранулоцитарного колониестимулирующего фактора приводит к эффективной мобилизации их в периферическую кровь, которая становится доступным источником аутологичных стволовых прогениторных клеток, что обеспечивает возможность проведения проангиогенной терапии у данной категории больных.

Исследование фенотипа выделенных из крови мононуклеарных клеток выявило наличие среди них эндотелиальных прогениторных клеток разной степени дифференцировки. Дана детальная характеристика их морфологических, фенотипических и функциональных свойств – оценена пролиферативная активность, способность к миграции и продукции цитокинов и ростовых факторов. Результаты показали, что введение гранулоцитарного колониестимулирующего фактора больным с хронической сердечной недостаточностью сопровождается увеличением спонтанной и стимулированной пролиферативной активности, способности к миграции, увеличением секреции проангиогенных и снижением секреции провоспалительных цитокинов.

Анализ корреляционных связей между фенотипом и уровнем секретируемых цитокинов позволил выделить субпопуляции клеток разной степени дифференцировки, вносящих основной вклад в продукцию цитокинов.

В следующей главе представлены результаты исследования свойств эндотелиальных прогениторных клеток, выращенных в культуре. Показано, что мононуклеарные клетки крови, полученные от пациентов с хронической сердечной недостаточностью после фармакологической стимуляции гранулоцитарным колониестимулирующим фактором, в культуре способны дифференцироваться в эндотелиальные прогениторные клетки.

Выделены две основные субпопуляции – «ранние» и «поздние» эндотелиальные прогениторные клетки, различающиеся по морфологии, пролиферативной активности и спектру продуцируемых цитокинов. Более того, автором выявлены существенные различия функциональных показателей клеток в зависимости от того, на каком субстрате их выращивали – на фибронектине или желатине.

Полученные результаты имеют теоретическую и практическую ценность. С одной стороны они дополняют представления о взаимодействии клеток с белками внеклеточного матрикса, с другой стороны позволяют оптимизировать протокол ангиогенной терапии.

Интересные данные получены в ходе наблюдения за «поздними» эндотелиальными прогениторными клетками по мере увеличения времени культивирования, в частности, установлена их способность образовывать скопления, выстраиваться в линию и формировать тубулярные структуры, что указывает на возможное участие этих клеток в развитии сосудов по типу васкулогенеза, по крайней мере, в культуре.

При знакомстве с данным разделом работы возникли **вопросы**.

Известно, что эндотелиальные клетки артерий, вен, лимфатических сосудов имеют фенотипические и функциональные отличия. На каком этапе дифференцировки эндотелиальных клеток в контексте данного исследования может происходить их «артериальная» или «венозная» специализация? Может ли такая специализация произойти в культуре клеток? Если да, то, какие эндотелиальные клетки – артериальные или венозные – будут первыми образовывать тубулярные структуры?

Важные результаты получены при изучении взаимоотношений эндотелиальных прогениторных клеток и зрелых эндотелиальных клеток (на примере

клеток эндотелиальной линии человека EA.hy926) в культуре. На основании анализа влияния продуктов, секретируемых эндотелиальными прогениторными клетками и зрелыми эндотелиальными клетками, на функциональные показатели тех и других, автор совершенно справедливо делает вывод о том, что в процессе формирования новых сосудов необходимо участие как прогениторных, так и зрелых эндотелиальных клеток. Подобные взаимодействия реально имеют место при образовании сосудов путем ангиогенеза.

Ценные с практической точки зрения результаты получены при клиническом использовании эндотелиальных прогениторных клеток. Установлено, что после интрамиокардиального введения мононуклеарных клеток периферической крови, обогащенных эндотелиальными прогениторными клетками, улучшается перфузия миокарда, увеличивается фракция выброса левого желудочка, повышается толерантность к физической нагрузке, в итоге снижается класс хронической сердечной недостаточности.

В порядке дискуссии хотелось бы задать несколько **вопросов**:

1. Имелись ли у пациентов сопутствующие заболевания, которые наряду с основным заболеванием могли бы повлиять на число и функциональную активность эндотелиальных прогениторных клеток?
2. Могут ли выявленные характеристики мононуклеарных клеток служить не только диагностическими, но и прогностическими маркерами у больных сердечнососудистыми заболеваниями?
3. В ходе проведенного исследования выполнены все поставленные задачи, достигнута цель – получен целый комплекс морфологических, фенотипических и функциональных характеристик мононуклеарных клеток крови у больных с хронической сердечной недостаточностью, проведено теоретическое обоснование применения этих клеток для стимуляции неоваскуляризации миокарда, получены обнадеживающие клинические результаты. Но что происходит с клетками после введения в миокард, какова их роль и судьба? Они являются лишь средством адресной доставки в очаг повреждения комплекса ростовых факторов, запускающих ангиогенную активность резидентных эндотелиальных клеток? Или именно эти эндотелиальные прогениторные клетки создают новую органоспецифическую сеть кровеносных сосудов? Есть ли данные о влиянии их на васкуло- и/или ангиогенез лимфатических сосудов в сердце?

В диссертационной работе 10 выводов, все они основаны на большом фактическом материале, полученном лично автором, содержат доказательства на положения, выносимые на защиту. По существу замечаний к выводам нет.

В диссертации Повещенко О. В. имеются практические рекомендации, касающиеся выбора методов получения суспензии мононуклеарных клеток из периферической крови и отдельных субпопуляций эндотелиальных прогениторных клеток для клинического применения; использования кондиционных сред, полученных при культивировании эндотелиальных прогениторных клеток, в качестве источника проангиогенных факторов; использования характеристик эндотелиальных прогениторных клеток в качестве дополнительных лабораторных критериев оценки функционального состояния миокарда; использования интрамиокардиального введения эндотелиальных прогениторных клеток с целью улучшения функционального состояния миокарда у больных с хронической сердечной недостаточностью в качестве альтернативного подхода при наличии у пациента толерантности к лекарственной терапии. Практические рекомендации могут служить основой для создания новых технологий лечения больных с хронической сердечной недостаточностью.

В целом диссертация производит хорошее впечатление, она современна, высокотехнологична, конкретна, обладает внутренним единством, написана заинтересованно, хорошим литературным языком. Рукопись аккуратно оформлена, хорошо иллюстрирована, встречаются единичные опечатки и неудачные выражения, но они не умаляют достоинств работы. Основные результаты исследования опубликованы в изданиях, рекомендованных ВАК. Автореферат полностью отражает содержание работы. Принципиальных замечаний к диссертационной работе Повещенко О. В. 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 по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология, является законченной научно-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.

Диссертация соответствует требованиям п. 9 Положения о присуждении ученых степеней (постановление Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени доктора медицинских наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология.

Официальный оппонент доктор медицинских наук
(14.03.01 – анатомия человека), профессор кафедры
физиологии факультета естественных наук
Новосибирского государственного университета



Обухова Лидия Александровна

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет»

630090, г. Новосибирск, ул. Пирогова, д. 2.

телефон (383) 330-32-42, e-mail: rector@nsu.ru

31 октября 2014 года

