

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора медицинских наук Акулинина Виктора Александровича на диссертацию **Повешенко Ольги Владимировны «Морфофункциональные характеристики субпопуляций мобилизованных из костного мозга мононуклеарных клеток крови при хронической сердечной недостаточности»**, представленную на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Актуальность избранной темы. Диссертация Повешенко О. В. посвящена актуальной проблеме современной медицинской науки – исследованию субпопуляций мобилизованных из костного мозга мононуклеарных клеток крови при хронической сердечной недостаточности.

Изменения в количественном содержании и функциональной активности эндотелиальных прогениторных клеток выявлены при многих заболеваниях. При этом снижение пролиферации, миграции эндотелиальных прогениторных клеток в очаг повреждения, изменение секреторной активности рассматривается в качестве возможного механизма развития ишемической болезни сердца и хронической сердечной недостаточности. Эти заболевания все еще остаются одной из основных причин инвалидности, возникающей у людей трудоспособного возраста. В связи с этим исследования, направленные на улучшение диагностики, лечения, прогноза и профилактики сердечно-сосудистых поражений имеют важное медицинское и социальное значение.

Несмотря на большое количество работ посвященных улучшению функционального состояния ишемизированных органов и тканей, целый ряд вопросов еще далек от полного разрешения. Исследования на животных и клинические испытания у человека показали, что использование ростовых проангиогенных факторов, а также введение различных популяций стволовых клеток, приводит к индукции неоангиогенеза, что сопровождается улучшением функционального состояния ишемизированных органов и тканей. Практически отсутствуют сравнительные данные о спектре секретируемых цитокинов у пациентов с хронической сердечной недостаточностью, насколько эффективно может происходить мобилизация клеток из костного мозга и изменяется ли их функциональная активность при введении G-CSF.

В диссертационной работе Повешенко О. В. дан анализ морфологических и функциональных свойств циркулирующих эндотелиальных прогениторных клеток пациентов с хронической сердечной недостаточностью, что позволяет

обосновать возможность использования стволовых/прогениторных клеток в лечении сердечно-сосудистых заболеваний, поэтому важность и своевременность данной работы не вызывает сомнений.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. Работа выполнена на достаточном объеме материала. Исследование проведено у 77 пациентов, страдающих ишемической болезнью сердца, с III–IV функциональным классом хронической сердечной недостаточностью. Для сбора исходной информации использован комплекс современных морфологических методов исследования. Применены адекватные поставленным задачам методы статистического анализа. Научные выводы объективно и полноценно отражают результаты проведенного исследования.

Работа включает 34 рисунка и микрофотографий хорошего качества, количественные данные представлены в 18 таблицах и 1 схеме. Список цитируемой литературы состоит из 386 источников, из них 353 иностранных. Проведен тщательный анализ и сравнение полученных результатов с данными других исследователей по рассматриваемой тематике.

Все положения и выводы основаны на фактах, полученных лично автором. Основные результаты диссертации опубликованы в 41 научной работе, 17 из них в ведущих рецензируемых научных журналах, рекомендуемых для публикаций основных результатов исследования; доложены на международных конференциях.

Таким образом, обоснованность положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертационной работе Повещенко О. В., сомнений не вызывают.

Оценка новизны, достоверность и ценность полученных автором результатов. В диссертационной работе Повещенко О. В., несомненно, полученные данные отражают новизну исследования. Впервые установлена эффективность мобилизации эндотелиальных прогениторных клеток из костного мозга в периферическую кровь у пациентов с тяжелой формой хронической сердечной недостаточностью. Проведено комплексное исследование фенотипа и функциональной активности эндотелиальных прогениторных клеток.

Впервые изучена пролиферативная активность мононуклеарных клеток пациентов с хронической сердечной недостаточностью, способность к миграции *in vitro*, установлен спектр секретируемых биологически активных веществ до и после мобилизации G-CSF.

Впервые получены эндотелиальные прогениторные клетки *in vitro* при культивировании моноклеарных клеток пациентов с хронической сердечной недостаточностью после мобилизации. Показано, что культивируемые в «ранние» (секретируют более высокий уровень IL-10, IL-18, IL-8, EPO, VEGF, TNF- α и NO) и «поздние» сроки эндотелиальные прогениторные клетки пациентов с хронической сердечной недостаточностью обладают различной пролиферативной и секреторной активностью. Продемонстрировано, что белки внеклеточного матрикса оказывают влияние на уровень секретируемых биологически активных веществ эндотелиальных прогениторных клеток при культивировании.

Впервые показано, что эндотелиальные прогениторные клетки пациентов и зрелые эндотелиальные клетки клеточной линии EA.hy926 взаимовлияют на функциональное состояние друг друга. Кондиционная среда, полученная при культивировании клеток, содержит проангиогенные факторы, которые обуславливают функциональный потенциал как недифференцированных, так и зрелых эндотелиальных клеток.

Результаты исследования являются значимыми для медицинской науки, исследовательской и клинической практики. Получены новые знания, расширяющие современные представления о фенотипах и функциональных свойствах как циркулирующих, так и полученных при культивировании эндотелиальных прогениторных клетках пациентов с хронической сердечной недостаточностью. Последнее расширяет представление о морфофункциональных свойствах стволовых и эндотелиальных прогениторных клетках, в том числе как источника применения в практической медицине.

Особую практическую значимость представляют данные, по выявленному влиянию условий и сроков культивирования на уровень секреторной активности эндотелиальных прогениторных клеток пациентов с хронической сердечной недостаточностью. Важной находкой является и то, что культивируемые в «ранние» сроки эндотелиальные прогениторные клетки способны проявлять паракринное действие, что необходимо учитывать при разработке методов трансплантации стволовых прогениторных клеток и оценке результатов при их введении.

Совокупность полученных результатов исследования Повещенко О. В. может явиться теоретической основой для дальнейших экспериментальных и клинических исследований, необходимых для разработки новых репаративных подходов в области клеточной терапии с хронической сердечной недостаточностью.

Оценка содержания диссертации, ее завершенность. Диссертационная работа Повещенко О. В. содержит все разделы: введение, обзор литературы, главы собственного исследования, включающие главу «Материал и методы исследования», главы с описанием результатов собственных исследований, «Обсуждение полученных результатов», выводы, практические рекомендации, список сокращенных терминов, список литературы.

Актуальность проблемы не вызывает сомнений. Цель исследования соответствует теме и заявленной специальности. Задачи исследования можно было бы объединить и сформулировать лаконичней, положения выносимые на защиту хорошо сформулированы, содержат наиболее важные результаты и в полной мере доказаны автором.

В литературном обзоре представлена современная литература, причем преобладает зарубежная литература, понятно, что это связано с передовыми технологиями и преобладанием публикаций за рубежом. Также положительным моментом работы является дублирование автором оригинальной английской аббревиатуры терминов. В целом обзор литературы написан хорошим литературным языком, четко структурирован, содержит сведения по всем разделам проведенного исследования.

Глава «Материал и методы исследования» построена традиционно, автор дает подробную характеристику групп пациентов. Методы исследования в полной мере соответствуют поставленной цели и задачам исследования. Статистический анализ проведен грамотно. Применен метод непараметрической статистики, позволяющий выявить достоверность различия признака в группах сравнения. Хотелось бы отметить современный уровень исследования, который выполнен на высоком методическом и профессиональном уровне.

В главе 3 собственных результатов исследования проведен анализ морфофункциональных свойств циркулирующих эндотелиальных прогениторных клеток у пациентов с хронической сердечной недостаточностью. Мононуклеарные клетки периферической крови, обогащенные эндотелиальными прогениторными клетками, обладают высокой функциональной активностью – пролиферативным и миграционным потенциалом, продуцируют широкий спектр цитокинов.

В главе 4 анализируются результаты морфофункциональных свойств культивируемых эндотелиальных прогениторных клеток пациентов с хронической сердечной недостаточностью. Эндотелиальные прогениторные клетки, культивированные в разные сроки, отличаются морфологически и

функционально. «Ранние» эндотелиальные прогениторные клетки, обладают низким пролиферативным потенциалом. «Поздние» эндотелиальные прогениторные клетки продуцируют биологически активные молекулы необходимые для поддержания пролиферативного потенциала клеток в культуре. Очевидно, что разный уровень цитокинов и ростовых факторов при культивировании на различных адгезионных белках говорит о регулируемой роли внеклеточного микроокружения на функциональное состояние эндотелиальных прогениторных клеток.

Глава 5 посвящена изучению взаимовлияния культивируемых эндотелиальных прогениторных клеток пациентов с хронической сердечной недостаточностью и зрелых эндотелиальных клеток линии EA.hy926. Установлено, что недифференцированные эндотелиальные прогениторные клетки и зрелые эндотелиальные клетки оказывают взаимовлияние на функциональное состояние – пролиферацию и миграцию путем паракринных механизмов. Продукты секреции эндотелиальных прогениторных клеток стимулируют пролиферацию и миграцию клеток эндотелиальной линии EA.hy926, а продуцируемые клетками эндотелиальной линии EA.hy926 биоактивные вещества в свою очередь увеличивают функциональный потенциал эндотелиальных прогениторных клеток пациентов с хронической сердечной недостаточностью.

В последней главе собственных результатов исследования характеризуется взаимосвязь параметров морфофункциональных свойств обогащенных эндотелиальными прогениторными клетками мононуклеаров периферической крови с показателями функционального состояния миокарда пациентов с хронической сердечной недостаточностью. Интрамиокардиальное введение обогащенных эндотелиальными прогениторными клетками мононуклеарных клеток пациентам с хронической сердечной недостаточностью привело к статистически значимому снижению функционального класса сердечной недостаточности. Причем количество эндотелиальных прогениторных клеток после мобилизации не зависит от возраста и количества перенесенных инфарктов.

Результаты диссертационной работы хорошо представлены и проанализированы. Достоинством работы является вклад в развитие нового научного направления – регенеративной медицины, которая напрямую связана с широким внедрением в клиническую практику методов клеточной терапии при лечении различных сердечно-сосудистых заболеваний. Необходимость разработки новых подходов лечения сердечно-сосудистой патологии диктуется

распространенностью хронической сердечной недостаточности, которая является одной из главных причин заболеваемости и смертности. Практические рекомендации диссертационного исследования могут служить основой для практики в выборе метода лечения и в дальнейшем для разработки новых технологических подходов больным с хронической сердечной недостаточностью.

В диссертационной работе 10 выводов, основанных на объективных данных, полученных лично автором, хорошо сформулированных и достоверных. Не вызывает сомнения современная статистическая обработка полученных результатов и использование высокоточных методов исследования.

Содержание автореферата соответствует материалам, представленным в диссертации, а основные результаты позволяют сделать обоснованные выводы, отражающие суть проведенного исследования. Результаты исследования доложены на Всероссийских и международных форумах.

В порядке обсуждения, хотелось бы задать несколько вопросов:

1. Как учитывался уровень циркулирующих эндотелиальных прогениторных клеток с факторы риска: например, курением, воспалением, возрастные изменения?

2. Хотелось бы подробней узнать, как меняется уровень эндотелиальных прогениторных клеток у больных с острым инфарктом с благоприятным исходом заболевания и при прогрессировании хронической сердечной недостаточности, особенно при риске осложнений сердечно-сосудистых заболеваний?

3. Сегодня методы лечения хронической сердечной недостаточности не способны восстанавливать структуру миокарда, а результатом лечения является достижение ремиссии. К какому длительному клиническому эффекту приводит стимулирование многоступенчатого процесса, такого как неоангиогенез?

Следует отметить, что замечания носят непринципиальный характер и не снижают научно-практической ценности диссертационной работы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Повещенко Ольги Владимировны «Морфофункциональные характеристики субпопуляций мобилизованных из костного мозга мононуклеарных клеток крови при хронической сердечной недостаточности», представленная на соискание ученой 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 24.09.2013г. № 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.

заведующий кафедрой гистологии, цитологии и эмбриологии

Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Омская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации

доктор медицинских наук (03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология), профессор *В.А. Акулинин*

27 октября 2014 г.



Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Омская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 644043, г. Омск, ул. Ленина, 12

Телефон +7 3812 233289,

E-mail:rector@omsk-osma.ru

Подпись *Акулинин В.А.*
заверяю *спец.-от УК*
Кембе П.А.