

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертацию Лыкова Александра Петровича на тему «Морфофункциональная характеристика мезенхимных стволовых клеток костного мозга человека и крыс при активации эритропоэтином», представленную на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 1.5.22. Клеточная биология.

Актуальность темы выполненной работы. В механизмах регенерации и репарации поврежденных тканей важнейшая роль принадлежит мезенхимным стволовым клеткам (МСК). Несмотря на огромное число работ, посвященных свойствам и функциям МСК, модификация их параметров под действием эритропоэтина (ЭПО) в литературе практически не описана.

МСК являются производными мезодермальной паренхимы и относятся к стволовым клеткам в силу способности к самообновлению и дифференцировки в различные типы клеток соединительной ткани. В костном мозге МСК формируют нишу для гемопоэтических стволовых клеток, а продукция цитокинов и ростовых факторов регулирует процессы кроветворения. При этом старение организма, острое повреждение или хронический иммуновоспалительный ответ в органах и тканях человека и животных уменьшают пул тканеспецифических стволовых клеток и/или нарушают их функциональные свойства, что существенно снижает их регенераторный потенциал. С возрастом и при воздействии неблагоприятных факторов на МСК может снижаться их пролиферативная и миграционная активность, способность к секреции иммунорегуляторных молекул и экспрессии антигенных детерминант, реализация аутофагии и жизнеспособность.

Свойство МСК стимулировать процессы репарации/регенерации поврежденных органов и тканей делает эти клетки привлекательными для использования в качестве альтернативного способа лечения. Терапевтический потенциал МСК реализуется через способность клеток заселять и выживать в очаге патологического повреждения, дифференцироваться в тканеспецифические клетки и/или оказывать паракринный эффект для активации местных стволовых клеток и привлечению МСК из костного мозга. МСК рассматривают как альтернативу традиционным способам лечения ишемии нижних конечностей и дегенеративно-дистрофических изменений позвоночника. Недостатком лечения данных процессов является кратковременный эффект от введенных стволовых

клеток как следствие значительной гибели стволовых клеток в условиях неблагоприятного микроокружения. Возможно, что предварительная обработка МСК с помощью ЭПО сможет увеличивать резистентность клеток к неблагоприятным факторам микроокружения и будет способствовать усилению их репаративного эффекта. Исследованию данной проблемы и посвящена диссертационная работа Лыкова Александра Петровича.

Новизна исследования, полученных выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. В результате выполнения работы были получены новые данные фундаментального характера, которые раскрывают не известные ранее аспекты влияния ЭПО на свойства МСК в условиях не только *in vitro*, но и *in vivo*. В диссертации Лыкова А.П. использован комплексный подход к изучению эффектов ЭПО на популяцию МСК костного мозга человека и крыс, включающий экспериментальный и аналитический этапы. В результате выполнения работы были получены новые фундаментальные данные, позволяющие оценить терапевтический потенциал биомедицинского клеточного продукта (МСК и сочетание МСК с ЭПО), ускоряющего регенеративные процессы при ишемии конечностей и дегенерации пульпозного ядра межпозвонкового диска.

Впервые установлено, что ЭПО влияет на экспрессию ЭПО-рецептора, ко-экспрессию ЭПО-рецептора/CD131 и CD131, молекул адгезии (CD18, CD18/54, CD54, CD44, CD49a, CD146) и маркера проангиогенного потенциала CD146 на МСК костного мозга человека.

Получены новые данные о том, что ЭПО оказывает протективное действие на МСК человека и крыс в условиях окислительного стресса, гипогликемии, гипергликемии и дефицита ростовых факторов, что проявляется в целом снижением доли клеток в апоптозе/некрозе, усилением пролиферации, миграции и секреции МСК, однако эффект ЭПО неоднозначен для различных факторов агрессии и различных свойств МСК. Уникальными явились данные об усилении под действием ЭПО интенсивности аутофагии в МСК и об увеличении плотности гранулярного ретикулума, что указывает на возрастание синтетической активности клеток.

Впервые установлена динамика изменения уровня провоспалительных и противовоспалительных цитокинов, ростовых факторов на системном (в

сыворотке крови) и локальном (в мышцах голени) уровне организма при лечении ишемии конечностей у крыс МСК и сочетании МСК с ЭПО. Впервые показано, что МСК и сочетание МСК с ЭПО усиливают регенерацию пульпозного ядра межпозвонкового диска при ее механическом повреждении в эксперименте.

Таким образом, в исследовании Лыкова А.П. получены и обобщены новые сведения о влиянии ЭПО на функциональную активность МСК костного мозга человека и крыс. Установлено, что этот ЭПО принимает непосредственное участие в регуляции морфо-функциональных свойств МСК и улучшает терапевтический эффект их использования.

Значимость для науки и практики полученных автором диссертации результатов. Полученные диссертантом результаты существенно расширяют представления о гемопэтиновой регуляции свойств МСК. Изучение комплексной реакции МСК костного мозга человека и крыс позволяют теоретически обосновать использование ЭПО для наделения стволовых клеток устойчивостью к неблагоприятным факторам микроокружения в очаге патологического процесса.

Результаты диссертационной работы Лыкова А.П. представляют собой теоретическую основу не только для разработки технологии управления процессами дифференцировки и созревания МСК с использованием ЭПО, но подтверждают эффективность их использования для лечения состояния критической ишемии конечностей и дегенеративно-дистрофических процессов в межпозвонковом диске. Это обосновывает целесообразность использования МСК, стимулированных ЭПО, для лечения и других заболеваний с ишемическими и дистрофическими расстройствами, таких как ишемическая болезнь сердца и дегенеративно-дистрофические поражения суставов, что задает вектор развития регенеративной медицины с помощью МСК с ЭПО и проведения подобных экспериментов в дальнейшем.

Автором сформулированы практические рекомендации, которые регламентируют дозы ЭПО и сроки культивирования с ним МСК для достижения наиболее выраженных протективных свойств данного клеточного биомедицинского продукта, что является важным для проведения дальнейших экспериментальных исследований и разработки клеточной терапии в клинической практике.

Конкретные рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы. Данные, полученные в ходе диссертационного исследования Лыкова Александра Петровича, используются в учебном процессе кафедры терапии, гематологии и трансфузиологии (ФПК и ППВ) ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России и в экспериментальной работе лаборатории физиологии протективной системы Научно-исследовательского института клинической и экспериментальной лимфологии (филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук»). Также результаты исследования могут быть внедрены в программы преподавания нормальной физиологии и патофизиологии, цитологии и смежных дисциплин студентам медицинских вузов, и для обучения медицинских кадров по программам профессиональной переподготовки и повышения квалификации. Результаты НИР могут применяться при проведении аналогичных работ в научно-исследовательских организациях медико-биологического профиля.

Степень обоснованности и достоверности научных положений, результатов и выводов, сформулированных в диссертации. Для подавляющего большинства полученных результатов обоснованность и достоверности достаточно высокая. Диссертационная работа Лыкова А.П. представляет собой самостоятельное научное исследование, выполненное на высоком методическом уровне. В работе использованы современные методы анализа, включающие в себя проточную цитофлуориметрию, иммуноферментный анализ, гистологическое исследование, иммуногистохимический анализ, оценку пролиферативной и миграционной активности МСК различными методами (соответственно МТТ-тест, колониеобразование, общий импеданс и вертикальная, горизонтальная миграция), электронную трансмиссионную микроскопию, оценку капиллярного кровотока методом доплеровской флуориметрии, магнитно-резонансную томографию, культуральные методы исследования *in vitro*, эксперименты *in vivo*. Полученные в исследовании результаты обработаны с использованием современных методов непараметрических статистических, что обуславливает их достоверность. Научные положения, выводы и практические рекомендации, представленные в диссертационной работе, подтверждаются

результатами анализа научной литературы и собственных экспериментальных данных, полученных диссертантом на репрезентативных выборках. Сформулированные автором выводы соответствуют поставленным задачам и раскрывают цель научной работы.

По материалам диссертации опубликовано 27 печатных работ, включая 14 статей в отечественных журналах, рекомендованных Перечнем ВАК РФ для публикации основных научных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата и доктора наук, из них – 13 статей в журналах, входящих в международную реферативную базу данных и систем цитирования Web of Science и/или Scopus и Перечень рецензируемых научных изданий ВАК квартал 1. Результаты проведенного исследования представлялись на обсуждение научной общественности на всероссийских форумах и конференциях, национальных конгрессах в г. Москве и г. Новосибирске.

Диссертационная работа Лыкова А.П. построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, главы с описанием материалов и методов исследования, главы с результатами собственных исследований, обсуждения, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы, а также имеет список иллюстративного материала и 3 приложения. Работа изложена на 315 страницах машинописного текста, иллюстрирована 24 таблицами и 42 рисунками, а также таблицами и рисунками в приложениях в конце диссертации. В работе представлены авторские схемы, отражающие дизайн исследования и суммирующие полученные диссертантом результаты. Список литературы достаточно обширен и содержит 505 источника, включая электронные ресурсы, из них 68 отечественных и 437 зарубежных.

Успешное выполнение исследования стало возможным благодаря детальному анализу источников информации, изложенному в *обзоре литературы*, который охватывает вопросы современных представлений о морфо-функциональных свойствах МСК различной локализации, способах их получения, терапевтических эффектах МСК при лечении различных заболеваний. В обзоре литературы описаны свойства ЭПО, экспериментальные и клинические данные о его использовании в терапии патологий человека и животных и влияние ЭПО на свойства МСК.

В главе *материал и методы исследований* подробно описаны объекты исследования, манипуляции, проводимые с животными, и соответствие их Хельсинской декларации, а также иммунологические, гистологические, функциональные, цитологические и культуральные методы исследования. Охарактеризованы методы статистической обработки полученных данных, которые соответствуют поставленной цели и содержат только методы непараметрической статистики. Дизайн исследования наглядно представлен в виде оригинальных схем.

Полученные *результаты собственных исследований* полно отражены в таблицах и графиках, каждый из которых имеет необходимый комментарий, хотя перенос таблиц на следующую страницу выполнены некорректно. Обращает на себя внимание очень большой объем проведенных исследований, их детальный анализ и наличие компактных заключений в каждом подразделе главы 3, что облегчает восприятие информации. Достоверность полученных результатов обеспечивается адекватностью применяемых статистических методов, представлением микрофотограмм, а также широким освещением полученных результатов в рецензируемых изданиях.

В разделе *обсуждение полученных результатов* автор анализирует с привлечением источников литературы и оценивает соответствие полученных результатов литературным данным, что занимает 18 страниц текста. Эксперименты *in vitro* позволили установить, что ЭПО в целом повышает резистентность МСК к изучаемым факторам агрессии по большинству изучаемых свойств этих клеток, хотя не по всем свойствам однозначно, способен модулировать их и оказывать антивозрастное действие на МСК при репликативном старении. В экспериментах *in vivo* показана наибольшая терапевтическая эффективность для МСК, стимулированных ЭПО, чем для не стимулированных МСК, как при лечении ишемии конечностей, так и при восстановлении межпозвонкового диска после его механического повреждения у крыс. Полученные закономерности сформулированы в 7-ми выводах, которые являются в своей большей части обоснованными, логично вытекают из содержания работы, соответствуют ее цели и задачам и отражены в основных положениях выполненного исследования.

Оформление автореферата отвечает установленным требованиям, а его содержание полностью соответствует содержанию диссертации и отражает ее основные разделы, положения и выводы.

Замечания и вопросы:

Имеется несколько замечаний к формулировкам и содержанию задач, положений, выводов:

1. Вывод № 7 и вторая часть положения № 4, утверждающие соответственно ускорение регенерации в пульпозном ядре межпозвонкового диска по увеличению количества клеток в нем и снижение некротического поражения мышечных волокон в ишемизированной конечности крыс, не обоснованы (как и аналогичные утверждения в научной новизне), т.к. результаты гистологического исследования данных тканей не представлены в цифровом виде и не подвергнуты статистическому анализу, а носят лишь демонстрационный и описательный характер.

2. Задача № 4 не отражает в полной мере сути эксперимента о влиянии ЭПО на выраженность репликативного старения МСК, которое изучалось на протяжении нескольких пассажей, а не при однократном внесении ЭПО в культуру. В конце задачи должно было бы звучать уточнение «...при репликативном старении этих клеток».

3. Задача № 6 сформулирована отвлеченно от сути исследования, в окончании ее формулировки должно звучать «...после введения МСК и МСК-ЭПО». Задачи не включают гистологического исследования мышц голени крысы, и в выводы эти результаты не вынесены, хотя такое исследование проводилось.

4. Положение № 3 содержит утверждение «Эритропоэтин проявляет антивозрастной эффект», которое должно иметь уточнение «...на мезенхимные стволовые клетки», иначе звучит так, что эритропоэтин замедляет старение всего организма.

5. В главе 2 отсутствуют критерии включения и исключения больных ишемической болезнью сердца в исследование.

6. В главе 3 не приведены числовые данные о пролиферативной активности МСК методом оценки импеданса клеток и не подвергнуты статистическому анализу. Продемонстрированы лишь графики с кривыми,

отражающими изменение импеданса во времени в пределах одной культуры клеток.

7. Дискутабельными являются результаты о защитном действии ЭПО в условия наличия факторов агрессии в культуре МСК, поскольку не проводились сравнения между группой «фактор агрессии в отсутствии ЭПО» и «фактор агрессии в присутствии ЭПО». Результаты этих двух групп сравнивались только с интактной культурой МСК в присутствии физиологической концентрации ростовых факторов.

8. Вывод № 2 неконкретен, поскольку используются фразы «Эритропоэтин инициирует изменения экспрессии...» и «...взаимодействия зависят от времени активации...», что соответственно рождает вопросы «Какие изменения? (усиление или угнетение)» и «Как зависит? (позитивно или негативно)».

9. Вывод № 3 и соответствующее ему утверждение в 4-м абзаце раздела «Научная новизна» не в полной мере отражают результаты исследования и не могут быть отнесены ко всем группам обследуемых, всем срокам и всем перечисленным свойствам МСК. Результаты по этим характеристикам неоднозначны и формулировки данных разделов требуют уточнения по типу объекта исследования, свойствам МСК и срокам культивирования, что обосновывает необходимость подразделения вывода №3 на два самостоятельных вывода.

В ходе ознакомления с диссертационной работой возникло несколько вопросов:

1. Чем обосновано использование трех методов оценки миграции (горизонтальная, вертикальная, по изменению импеданса) МСК и трех методов оценки пролиферации МСК (по изменению импеданса, МТТ-тест, оценка КОЕ)? В итоге на основе какого из трех методов сформулированы выводы и положения об изменении пролиферативной и миграционной активности (т.к. по разным методам их оценки результаты неоднозначные)?

2. Возможно ли, что увеличение концентрации ЭПО в культуре МСК после внесения ЭПО вызвано его внесением, а не усилением продукции клетками?

3. Как факт задержки МСК в фазе покоя G0G1 и уменьшения числа клеток в фазах S и G2/M по данным оценки фаз клеточного цикла под влиянием ЭПО (табл.16) соотносится с феноменом увеличения пролиферативной активности МСК по оценке импеданса (рис. 18-20) и МТТ-теста (рис. 14-15)? Не является ли это противоречием?

4. Как объяснить, что МСК улучшают восстановление микроциркуляции в стопе на 1-е, 7-е, 14-е сут, а МСК с ЭПО не имеют восстановительного эффекта в эти сроки, но проявляют его к 28 сут?

5. Как объяснить реакцию МСК на введение физиологического раствора в виде многократной активации синтеза ИЛ-1 и NO на 7-е сутки и многократного угнетения синтеза ИЛ-1 на 14-е сут? Как этот раствор может вызвать такие изменения МСК?

6. Почему при введении в ишемизированную стопу крысы МСК, стимулированных ЭПО, обеспечивается меньший уровень ЭПО в крови (на 14–28-е сут), чем при введении не стимулированных МСК?

Заключение

Диссертационная работа Лыкова Александра Петровича на тему «Морфофункциональная характеристика мезенхимных стволовых клеток костного мозга человека и крыс при активации эритропоэтином», представленная на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 1.5.22. Клеточная биология, является научно-квалификационной работой, содержащей решение актуальной научной проблемы по выявлению закономерностей модулирующего влияния эритропоэтина на свойства и терапевтический потенциал мезенхимных стволовых клеток, что имеет важное значение для клеточной биологии. Полученные автором научные результаты, положения и выводы, сформулированные в диссертации, являются оригинальными, достоверными и обоснованными, имеют как фундаментальное, так и прикладное значение. Принимая во внимание объем и сложность проведенных исследований, важность полученных результатов для науки и регенеративной медицины, необоснованность лишь одного из выводов и соответствующего ему положения, посвященных гистологическому исследованию тканей животных, не является препятствием для присуждения диссертанту искомой степени. Представленная

диссертационная работа Лыкова Александра Петровича соответствует требованиям п. 9 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842 (с изменениями и дополнениями), предъявляемым к докторским диссертациям, а ее автор Лыков Александр Петрович заслуживает присуждения ученой степени доктора медицинских наук по специальности 1.5.22. Клеточная биология.

Официальный оппонент:

Профессор кафедры
патофизиологии ФГБОУ ВО
СибГМУ Минздрава России,
доктор медицинских наук, доцент



Чумакова Светлана Петровна

«15» ноября 2023 г.

Данные об авторе отзыва:

Чумакова Светлана Петровна – доктор медицинских наук, доцент, профессор кафедры патофизиологии ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России, 634050 г. Томск, ул. Московский тракт, 2, телефон раб. 8(3822)901-101 доб. 1742, моб. 8-909-539-51-09), e-mail: chumakova_s@mail.ru.

