

Отзыв

официального оппонента, доктора медицинских наук, главного научного сотрудника лаборатории клинической иммунопатологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» Селедцовой Галины Викторовны на диссертационную работу Лыкова Александра Петровича на тему: «Морфофункциональная характеристика мезенхимных стволовых клеток костного мозга человека и крыс при активации эритропоэтином» по специальности 1.5.22.- Клеточная биология на соискание ученой степени доктора медицинских наук.

Актуальность избранной темы определяется тем, что в настоящее время очень ограничены возможности повышения регенерации тканей в условиях развития дегенеративных заболеваний или восстановления тканей и органов после травмы. В данной работе исследована возможность использования эритропоэтина (ЭПО) для активации мезенхимных стромальных клеток (МСК) человека и крысы, определены морфологические и функциональные изменения клеток после воздействия ЭПО.

Научная новизна и достоверность полученных знаний.

Научная новизна. Впервые в работе проанализировано многостороннее влияние ЭПО на структуру и функцию МСК человека и крысы. Доказано, что ЭПО является антиапоптотическим агентом, инициирует изменения экспрессии молекул межклеточного взаимодействия, ассоциированных с проангиогенным действием МСК. **Достоверность** результатов обеспечена выбором самых современных методов исследования, достаточным количеством воспроизводимых экспериментов. Применены адекватные методы статистической обработки данных. Выводы диссертации, вытекают из результатов работы.

Значимость для науки и практики полученных автором результатов.

Научная значимость исследования заключается в том, что с помощью ЭПО можно существенным образом изменить свойства МСК, взятых на

определенном пассаже культивирования, усилить их прорегенераторные свойства. При проведении экспериментов *in vivo* на моделях ишемии конечности и в модели дегенерации межпозвонкового диска крысы показана возможность использования активированных ЭПО МСК с целью усиления регенераторных свойств клеток, отражающихся на конечном терапевтическом эффекте восстановления поврежденного органа.

Оценка содержания диссертации, ее завершенность. Диссертационная работа Лыкова А.П. посвящена исследованию влияния ЭПО на функциональную активность МСК человека и экспериментальных животных в условиях *in vitro* и *in vivo*. Диссертационная работа логически выверена, выполнена на мезенхимных стволовых клетках, полученных из двух различных источников- клетки человека и клетки крысы. МСК участвуют в восстановлении тканей после их механического, токсического или гипоксического повреждения, поэтому изучение целенаправленного изменения и усиления их функций в конкретных, прикладных случаях является необходимым этапом разработки эффективного инструмента применения МСК в практическом здравоохранении. В литературном обзоре очень подробно описываются методы получения, рецепторный репертуар, продукция регуляторных цитокинов и участие МСК в процессах восстановления при различных патологиях. Большой раздел литературного обзора посвящен структуре и функциям ЭПО и его рецептора, механизмам взаимодействия с клетками. Раздел «Материалы и методы» содержит описание методов исследования, которые характеризуют структуру и функцию МСК. Методы описаны очень подробно, их количество и технологичность поражают воображение. Исследования выполнены с использованием как клеток или их компонентов, выделенных из культуры и специально приготовленных для исследования, так и подхода, позволяющего фиксировать изменения клеток в временных промежутках при культивировании клеток, непосредственно в культуре. В диссертационном исследовании представлены данные по влиянию ЭПО на

клетки организма, не связанные с кроветворением, но, как и эритропоэз, системным образом вовлеченные в восстановление организма после какого-либо трагического воздействия. Эритропоэтин- это известный стимулятор эритропоэза, с помощью которого незрелые формы эритроцитов превращаются в зрелые, увеличивается их количество в кровотоке и тканях, что улучшает оксигенацию тканей и, опосредованно, их функцию. Влияние ЭПО на морфологию и функцию МСК выполнено так многосторонне, как только возможно на современном этапе развития методов исследования. Результаты исследования представлены в динамике. МСК человека и крысы исследовались на разных стадиях культивирования, это 3, 4, 8 пассажи и при различных временных интервалах культивирования с ЭПО- 1 час и 72 час. На всех этих точках исследовался репертуар рецепторов, продукция регуляторных молекул, миграционные и пролиферативные способности клеток. Результаты, полученные с использованием МСК человека и крысы были сопоставимы. Это значит, что данные, полученные Лыковым А.П. в работе имеют фундаментальный характер и данные, полученные на крысах, могут быть с уверенностью экстраполированы на человека и применены у человека без опаски получить тяжелый побочный эффект от лечения. В работе смоделированы *in vitro* условия окислительного стресса, дефицита ростовых факторов. В этих условиях исследовано влияние ЭПО на пролиферативный ответ МСК, их миграцию, апоптотическую направленность, способность к колониеобразованию. Пролиферацию и миграцию оценивали по данным клеточного импеданса в режиме реального времени. Прочитав методы исследования, я для себя уяснила следующее: клетки помещаются в лунки планшета, к дну которых подходят датчики. При изменении формы клеток, их движения, меняются какие-то интегральные, возможно, электрические импульсы. После обработки машиной информации, эти изменения интегративно выражаются в изменении клеточного индекса, который и отражает изменения количества клеток, качества прикрепления клеток и морфологию клеток в лунке.

Поясните, пожалуйста, как с помощью этого прибора можно измерить отдельно пролиферацию и отдельно миграцию клеток, которые представлены на рисунках? Не очень понятно как оценивалось колониеобразование, если учесть, что МСК- это адгезионная культура, все манипуляции с клетками выполняли на 3- 4 пассаже, когда клеточная культура представляла собой сплошной монослой. Очень понравились эксперименты с «горизонтальной» миграцией. Для исследования горизонтальной миграции применялся тест «раневой поверхности», для чего в монослое МСК наконечником пипетки делалась брешь в виде полоски путем удаления клеток. Далее отслеживался процесс восстановления монослоя клеток и скорость его восстановления при различных экспериментальных воздействиях. На представленных картинках убедительно показано изменение миграции клеток после культивирования их с ЭПО. Вообще, на основании исследования можно сделать вывод, что наиболее функционально активной популяцией МСК являются клетки 3 пассажа культивирования, обработанные в течение 1 часа ЭПО. В работе Лыкова Александра Петровича использован метод электронной микроскопии для анализа морфометрических показателей клеток. При анализе полутонких срезов МСК, росших в стандартных условиях культивирования клеток, отмечено рыхлое расположение клеток, в части клеток выявлены фигуры митоза, а в части клеток - признаки апоптоза. В то же время МСК-ЭПО имели более плотное расположение, в части клеток имеются фигуры митоза и не выявлено морфологических признаков апоптоза. При исследовании объемной плотности мембран «гранулярного» эндоплазматического ретикулула и наличия полисом в культурах МСК и МСК+ЭПО, показано что в культурах МСК+ЭПО клетки имели более плотное расположение, в части клеток обнаружены фигуры митоза и не выявлено морфологических признаков апоптоза. Таким образом, даже на уровне органелл показано позитивное влияние ЭПО на МСК. В работе нет сведений о влиянии ЭПО на дифференцировку МСК в хондрогенном, остеогенном или адипогенном направлении. Есть ли такие сведения в литературе или Ваших

исследованиях? Можно ли с помощью культивирования с ЭПО получить популяцию клеток для какого-то конкретного случая применения, например для регенерации хряща сдвинуть дифференцировку в хондрогенном направлении? Очень понравились эксперименты по моделированию критической ишемии конечностей. Микроциркуляция оценена с помощью высокоточного оборудования, достоверность полученных результатов очевидна. Показано, что однократное введение в толщу мышц голени крыс сразу после моделирования ишемии в конечности МСК и МСК+ЭПО значительно увеличивало количество сосудов, питающих мышцы, по сравнению с группами контрольный животных. Показано значительное увеличение количества сосудов, питающих мышцы голени в группе крыс МСК+ЭПО, особенно в отдаленном периоде, на 28 день исследования. Высокотехнологичным выглядит раздел работы, посвященный исследованию терапевтического потенциала биомедицинского клеточного продукта (МСК и МСК+ЭПО) при экспериментальной модели дегенерации межпозвонкового диска у крысы, вызванного пункцией межпозвонкового диска хвостового отдела позвоночника. В тексте представлены томографические снимки позвоночника крыс, гистологические картинки диска в процессе постановки эксперимента, что выглядит очень достойно. При проведении экспериментов *in vivo* на моделях ишемии конечности и при дегенерации межпозвонкового диска не указано на каком пассаже культивирования использовались МСК и время их экспозиции с ЭПО. В результате этих очень красивых и технологически сложных экспериментов показано усиление регенераторных свойств клеток МСК+ЭПО по сравнению с МСК.

Заключение. Таким образом, диссертационная работа Лыкова Александра Петровича на тему: «Морфофункциональная характеристика мезенхимных стволовых клеток костного мозга человека и крыс при активации эритропоэтином» является научно-квалификационной работой в которой всесторонне охарактеризованы свойства мезенхимных стволовых клеток костного мозга как человека, так и крыс при воздействии эритропоэтина как

в условиях *in vitro* , так и в условиях *in vivo*. Это исследование имеет важное значение для биологии и фундаментальной медицины и соответствует критериям, которым должны отвечать диссертации на соискание ученых степеней, установленным «Положением о присуждении ученых степеней», утвержденным постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 (с изменениями), а ее автор заслуживает присуждения искомой ученой степени доктора медицинских наук по специальности 1.5.22.- Клеточная биология.

Официальный оппонент:

главный научный сотрудник лаборатории клинической иммунопатологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» Селедцовой Галины Викторовны

630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, д. 14.

Тел. (383) 222-26-74, e-mail: galina-seledtsova@yandex.ru

Доктор медицинских наук
Викторовна

Селедцова Галина

