

В диссертационный совет Д002.111.01
при Федеральном государственном
бюджетном учреждении науки
Государственном научном центре
Российской Федерации – Институте
медико-биологических проблем
Российской академии наук

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук Плотникова Егора Юрьевича на диссертационную работу Ратушного Андрея Юрьевича «Репликативное старение мезенхимальных стромальных клеток человека в условиях с различным содержанием кислорода», представленную на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальностям 03.03.01 – физиология; 03.03.04 - клеточная биология, цитология, гистология.

Актуальность исследования

Активное развитие в последнее десятилетие медицинских биотехнологий и, в частности клеточных технологий, делает необычайно актуальными любые исследования, направленные на понимание фундаментальных механизмов терапевтических эффектов различных типов стволовых и прогениторных клеток. Использование мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) для создания биомедицинских продуктов и дальнейшее клиническое продвижение клеточных технологий невозможно без понимания поведения этих клеток в культуре, в частности, репликативного старения, поскольку этап культивирования является неотъемлемой и основной частью их использования для терапии.

Множество исследований, как экспериментальных, так и клинических, продемонстрировали высокий терапевтический потенциал ММСК для лечения самых разных патологий. Несмотря на продолжающиеся исследования конкретных механизмов положительных эффектов, реализующихся при введении экзогенных ММСК, в этой области остается еще много «белых пятен». Список соединений, опосредующих терапевтические эффекты ММСК, на данный момент весьма обширен и включает целый ряд цитокинов, пептидов, микроРНК, компонентов внеклеточного

ИМБН

Вход. в

08/1316

07.10.06.2019

матрикса и даже целые органеллы. Однако наибольшей проблемой является значительная гетерогенность данной популяции клеток, зависящая как от источника их получения, так и условий культивирования. Поэтому и эффекты трансплантации таких клеток будут сильно зависеть от особенностей функционирования ММСК как живой системы, даже несмотря на стандартизацию клеток по определенным общепринятым фенотипическим критериям.

Все эти особенности диктуют необходимость и актуальность тщательного исследования влияния микроокружения ММСК на их биохимические и физиологические параметры, а в конечном счете и на терапевтические свойства. Одним из важнейших факторов, влияющих на биологию ММСК, является парциальное давление кислорода в окружающей среде, что особенно важно с учетом того, что этот параметр серьезным образом отличается в биологической нише ММСК *in vivo* и в условиях культивирования *in vitro*.

Научная новизна исследования и научно-практическая значимость полученных результатов

В работе впервые проведен комплексный анализ изменений в мультипотентных мезенхимальных стромальных клетках, происходящих в процессе длительного культивирования, что моделирует ситуацию длительного ведения стволовых клеток в условиях культуры для наращивания терапевтически адекватной биомассы. Особо следует отметить, что все исследования проводились как в условиях классического культивирования в нормоксии, так и при пониженной концентрации кислорода, которая близка к тканевой концентрации кислорода. Такой подход является очень перспективным и оправданным для дальнейшего использования полученных результатов, поскольку гипоксические условия, подобранные в работе, могут лучше отражать поведение мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток в организме, а не в искусственных условиях культивирования *in vitro*.

Действительно, впервые показано, культивирование ММСК при 5% O₂ оказывает положительное влияние на пролиферативные свойства клеток и снижает количество клеток с активной β-галактозидазой. Более того выявлено, что при культивировании в условиях гипоксии происходят изменения активности митохондрий и лизосом, снижается выраженность окислительного стресса по сравнению с культивированием при 20% кислорода.

Очень интересными и практически значимыми представляются полученные Ратушным А.Ю. данные о паракринной активности и экспрессии генов в ММСК при репликативном старении. Впервые показано снижение продукции TGF β при перманентном поддержании кислорода на уровне 5%. Кроме того, культивирование ММСК при 5% O₂ позволяет смягчить изменения экспрессии генов, ассоциированных со старением. При этом длительное культивирование во всех случаях снижало экспрессию HIF1A, основного регулятора реакции на гипоксию, что ранее никем не показано и имеет первостепенное значение для интерпретации многих процессов, ассоциированных с клеточным старением (сенесценсом). Все это указывает на необходимость создания подходов к оптимальному культивированию ММСК для сохранения их терапевтических свойств, в том числе, за счет поддержания паттерна экспрессии, характерного для молодых клеток.

Степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Примененные автором самые современные молекулярно-биологические и цитологические методы полностью адекватны поставленным задачам. Работа выполнена на большом объеме экспериментального материала с применением таких передовых подходов как лазерная конфокальная сканирующая микроскопия, проточная цитометрия, транскриптомный анализ.

Представленные в работе результаты достоверны, сделанные выводы обоснованы и подтверждены экспериментальными данными. Все это позволяет сделать заключение о высокой репрезентативности результатов и выводов диссертации. Представленные в автореферате и публикациях Ратушного А.Ю. результаты полностью отражают проведенные исследования.

Оценка содержания диссертации

Диссертация построена по традиционному плану. Результаты получены лично автором. Они логично изложены достаточно хорошим литературным языком. Выводы обоснованы большим фактическим материалом, логично сформулированы и в полном объеме отражают результаты исследования. Работа иллюстрирована 36 рисунками, микрофотографиями отличного качества, содержит 5 таблиц. В списке литературы процитировано 399 отечественных и зарубежных источников, имеются ссылки на публикации последних лет – 2017-2018 гг.

Во введении автор обосновывает актуальность исследования, его объект и цели, определяет научную новизну и практическую значимость работы. Обзор литературы, охватывающий результаты классических и современных исследований, имеющих отношение к теме диссертации, в полной мере отражает современное состояние исследуемой проблематики. Все приведенные в обзоре литературы данные указывают на чрезвычайную важность и актуальность предпринятого исследования.

Экспериментальные методы, использованные в представленном исследовании, указывают на высокий профессиональный уровень работы.

Замечания по диссертации

При знакомстве с представленным экспериментальным материалом возникают небольшие замечания, требующие дополнительных комментариев и разъяснений диссертанта:

1. К сожалению, текст диссертации и автореферата недостаточно выверен и содержит некоторое количество опечаток и ошибок (в том числе в построении фраз), что порой усложняет понимание мыслей, которые хотел выразить автор.

2. Изменения функций митохондрий при репликативном старении (длительном культивировании) и при действии гипоксии имеют одинаковую направленность. Как автор трактует такую схожесть эффекта и не является ли это проявлением негативного влияния гипоксии?

3. Накопление бета-галактозидазы, ассоциированной со старением, и имеющей другой оптимум pH для активности, не является ли проявлением изменений во внутриклеточном pH при репликативном старении?

4. Насколько изменения, происходящие при старении МСК в культуре, отражают процессы, происходящие *in vivo* при старении организма?

Заключение

Диссертация Ратушного Андрея Юрьевича «Репликативное старение мезенхимальных стромальных клеток человека в условиях с различным содержанием кислорода», выполненная под руководством д.м.н., проф., чл.-корр. РАН Л.Б. Буравковой и представленная на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальностям: 03.03.01 – физиология, 03.03.04 - клеточная биология, цитология, гистология, является завершённой научно-квалификационной работой, содержащей решение актуальной задачи – изучения влияния содержания кислорода в

среде культивирования на механизмы репликативного старения мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток человека.

Диссертационная работа соответствует требованиям п. 9-14 «Положения о присуждении учёных степеней», утверждённого Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени кандидата наук, а её автор Ратушный Андрей Юрьевич заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальностям: 03.03.01 – физиология, 03.03.04 - клеточная биология, цитология, гистология.

Официальный оппонент:

Плотников Егор Юрьевич

доктор биологических наук, заведующий лабораторией структуры и функции митохондрий НИИ Физико-Химической Биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова»

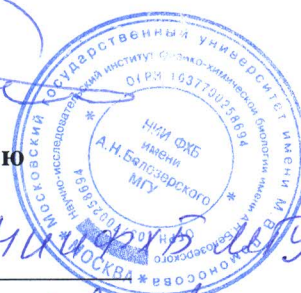
адрес: 119234, г. Москва, ГСП-1, Ленинские горы МГУ 1, стр. 73

телефон: 89165542339

адрес электронной почты:
plotnikov@mail.genebee.msu.ru

Подпись Плотникова Е.Ю. заверяю

(фамилия, должность заверяющего)



«07 июня» 2019 г.

ПЕЧАТЬ