



МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ

**НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
КАРДИОЛОГИИ**

(ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России)

ОГРН 1037739144640 ИНН 7731243467
121552, г. Москва, ул. 3-я Черепковская, д. 15А
Тел.: +7(499)140-93-36, факс: +7(495)414-60-31
www.cardioweb.ru, e-mail: info@cardioweb.ru

Исх. № 01/2250 от 06.11.2020
на № _____ от _____

«УТВЕРЖДАЮ»



Генеральный директор
ФГБУ «НМИЦ кардиологии»
Минздрава России,
академик РАН, д.м.н., профессор

С.А. Бойцов

ОТЗЫВ

на диссертационную работу Жидковой Ольги Владимировны на тему: «Взаимодействие мезенхимальных стромальных и эндотелиальных клеток в условиях пониженного содержания кислорода и провоспалительной активации», представленную на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям 03.03.01 – физиология и 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Актуальность темы исследования

Мезенхимальные стромальные клетки (МСК) представляют собой популяцию прогениторных клеток организма, и обладают целым рядом полезных свойств, что делает их перспективным инструментом клеточной терапии. В организме человека МСК присутствуют в качестве компонента стромы практически всех органов и тканей. Помимо стромообразующей функции, они являются участниками физиологического и репаративного замещения тканей благодаря способности мигрировать в зону повреждения, секретировать трофические факторы, дифференцироваться в различные клеточные типы, продуцировать компоненты внеклеточного матрикса. МСК могут отличаться по некоторым фенотипическим характеристикам в зависимости от тканевой локализации. Исследования функциональной активности популяции МСК из жировой ткани представляют особый интерес для прикладной медицины, что связано с большей доступностью их выделения по сравнению с клетками костного мозга.

ИМБН
Вход. в 08/2466
от 10.11.2020

Несмотря на широкое применение в клинике, механизмы, регулирующие терапевтический потенциал МСК, требуют дальнейшего изучения. Исследования последних лет показали, что вовлечение МСК в те или иные физиологические и патологические процессы происходит в ответ на стимулы, формируемые их локальным микроокружением. Актуальной задачей на сегодняшний день является тщательное изучение роли компонентов периваскулярной ниши в регуляции биологических свойств стромальных клеток, их способности участвовать в физиологическом обновлении ткани и в репаративных процессах при повреждении. Для изучения взаимного влияния мезенхимных стромальных и эндотелиальных клеток удобно использовать модель *in vitro*, в которой за счёт контактных механизмов и паракринных факторов происходит взаимодействие между этими клетками. Физиологический уровень концентрации O_2 в тканях гораздо ниже, чем атмосферный, обычно используемый для культивирования клеток, что отражается на их функциональной активности, однако модель *in vitro* позволяет приблизить этот параметр к значениям внутри тканевой ниши МСК. Исследования комплексного влияния эндотелия и гипоксии как факторов микроокружения необходимы для расширения понимания механизмов, контролируемых репаративные свойства МСК в организме. В связи с этим, актуальность работы Жидковой О.В. не вызывает сомнений.

Научная новизна проведенных исследований и полученных результатов

Данная работа одна из первых характеризует взаимное влияние МСК и эндотелия при пониженном содержании кислорода *in vitro*. В ходе исследования проведена оценка уровня коммитированности, клоногенного потенциала, экспрессии адгезионных молекул и подвижности МСК после их взаимодействия с интактными и активированными эндотелиальными клетками; проанализировано влияние межклеточного взаимодействия на паракринную активность мезенхимальных стромальных и эндотелиальных клеток, а также проведено изучение эффектов МСК на свойства активированных эндотелиальных клеток. Работа показала, что конечные модификации свойств, связанных с регенеративным потенциалом МСК, при взаимодействии с эндотелием сосудов зависят от ряда факторов, в том числе от концентрации кислорода в среде (атмосферная/физиологическая/гипоксический стресс), а также от наличия провоспалительной активации эндотелиальных клеток.

В данной работе впервые показано, что даже краткосрочный контакт с эндотелием (как интактным, так и активированным) способен вызвать изменения в МСК в

транскрипции генов, регулирующих процессы деления (*OCT4*, *SOX2*, *NANOG*) и дифференцировки (*RUNX2*, *SOX9*) МСК, что функционально не влияет на способность клеток делиться с образованием колоний после пассирования.

Получены новые данные о модулирующем влиянии эндотелия сосудов на экспрессию адгезионных молекул (интегринов $\alpha 1$, $\alpha 4$, $\alpha V\beta 3$, N-кадгерина ICAM-1) и подвижность МСК. При этом сравнительный анализ показала, что только активированные эндотелиальные клетки индуцируют экспрессию ICAM-1 и увеличивают скорость ненаправленной миграции МСК.

Впервые охарактеризована паракринная активность МСК и эндотелия в сокультуре при различном содержании O_2 и продемонстрировано, что в регуляции продукции IL-6 и IL-8 играет роль как активация эндотелия, так и депривация O_2 . В сокультуре МСК и активированного эндотелия оба типа клеток показывали более значимое увеличение экспрессии гена *IL8* и продукции самого цитокина. В условиях гипоксического стресса взаимодействие МСК с интактным и активированным эндотелием способствовало увеличению продукции IL-8 и его транскрипционной активности в МСК. В то же время депривация O_2 до 0.1 % делала стимулирующее влияние на продукцию и экспрессию IL-6 менее заметным.

В работе впервые продемонстрировано, что МСК защищают эндотелий от повреждающего действия провоспалительной активации и гипоксического стресса, снижая избыточную продукцию NO и уровень адгезии иммунных клеток к эндотелиальным.

Теоретическая и практическая значимость

Результаты проведённого исследования с использованием *in vitro* модели взаимодействия мультипотентных мезенхимных стромальных клеток с интактными и активированными эндотелиальными клетками в условиях, приближенных к физиологическим, помогают лучше разобраться в фундаментальных процессах, лежащих в основе функционирования прогениторных клеток как участников регенеративных процессов, происходящих в периваскулярной тканевой нише. Настоящее исследование также вносит вклад в развитие представлений об особенностях реализации свойств мезенхимных клеток при их внутрисосудистом введении в организм, так как при данном способе трансплантации МСК трансмигрируют из кровеносного русла в ткань через эндотелиальную выстилку сосуда. Данный методический подход будет полезен для изучения механизмов регуляторной активности МСК в отношении провоспалительной активации сосудистого эндотелия при воспалительных и ишемических заболеваниях и

поиска путей повышения терапевтического потенциала стромальных клеток для лечения этих заболеваний.

Практическую значимость имеют данные о негативном влиянии значительной депривации O_2 (0.1%) на взаимодействие МСК и эндотелия, что выражается в более активном прикреплении иммунных клеток к эндотелиальным, а также ослаблении способности МСК снижать адгезивные свойства эндотелия. Гипоксический стресс также способствовал большему сдвигу транскрипционного профиля МСК в сторону коммитированности, и частично снижал индуцирующее влияние взаимодействия на транскрипционную активность *IL6* и суммарную продукцию этого цитокина клетками. Полученные данные могут указывать на необходимость разработки протоколов предварительного кондиционирования МСК перед трансплантацией пациентам с целью повышения их устойчивости к действию неблагоприятных факторов микроокружения.

Структура и содержание диссертации

Работа выполнена на базе Федерального Государственного бюджетного учреждения науки Государственного научного центра Российской Федерации – Института медико-биологических проблем РАН, в лаборатории Клеточной физиологии. Диссертационная работа изложена на 143 страницах машинописного текста, содержит 33 рисунка и 19 таблиц. Работа написана в традиционном стиле и включает следующие разделы: введение (6 страниц), обзор литературы (32 страницы), материалы и методы исследования (13 страниц), результаты и обсуждение (53 страницы), заключение, выводы. В списке литературы указано 425 источника, из них 14 на русском и 411 на иностранном языке.

В Обзоре литературы представлена характеристика основных свойств мезенхимных стромальных и эндотелиальных клеток, описаны эффекты провоспалительных цитокинов и снижения концентрации O_2 в среде на МСК, проведен анализ имеющихся сведений о влиянии эндотелия на основные свойства стромальных клеток при моделировании контактного и паракринного взаимодействия клеток, представлена информация о роли МСК в регуляции изменений функциональной активности эндотелиальных клеток, вызванных воспалительными стимулами. Проведен анализ степени изученности проблемы, выделены нерешенные вопросы.

Содержание главы «Материалы и методы» указывает на высокий методический уровень и тщательную проработку проведенного исследования. В работе использованы современные методы биологических исследований: клеточное культивирование *in vitro*, проточная цитофлуориметрия, иммуноферментный анализ, анализ экспрессии генов,

световая и флуоресцентная микроскопия. Все полученные данные подвергнуты тщательной статистической обработке. Автором выполнен большой объем работы, использованные в эксперименте методы адекватны для решения поставленных в работе задач.

Результаты собственных исследований и их обсуждение представлены в главе 3, которая включает в себя 5 основных подразделов. Первый раздел посвящен анализу устойчивости МСК и клеток сосудистого эндотелия к действию провоспалительных цитокинов (интерферон- γ , фактор некроза опухоли α) и краткосрочному (24 часа) снижению содержания O_2 в среде (5% O_2 и 0,1% O_2). Во втором и третьем разделе охарактеризованы влияние интактного и активированного эндотелия на свойства МСК при 20% O_2 , что соответствует общепринятым условиям культивирования, при 5% O_2 , что соответствует уровню оксигенации в физиологической нише МСК, а также при 0,1% O_2 , что характерно для ишемизированных тканей. Автор показал, что некоторые модификации свойств МСК, такие как изменение миграционной активности и экспрессии молекул адгезии, обусловлены самим взаимодействием с эндотелием, и не зависят от концентрации O_2 в среде культивирования. Было также обнаружено, что на изменения паракринной активности и профиля транскрипции генов-регуляторов дифференцировки и пролиферации оказывает влияние взаимодействие с эндотелием и сопутствующая депривация O_2 до 0,1%. В четвертом разделе проведена оценка способности МСК уменьшать негативные эффекты депривации O_2 и провоспалительной активации в эндотелиальных клетках. Показано, что МСК не влияют на экспрессию молекул адгезии, вовлеченных во взаимодействие эндотелия с иммунными клетками, частично снижают избыточную продукцию оксида азота, вызванную гипоксическим стрессом и действием фактора некроза опухоли- α , а также уменьшают адгезию иммунных клеток к активированному эндотелию. Представлены данные, свидетельствующие о том, что кратковременное снижение содержания O_2 до 0,1% ослабляет позитивное влияние МСК на эндотелиальную дисфункцию.

В разделе «Обсуждение» представлена оригинальная трактовка полученных автором результатов, их сопоставление с мировым уровнем исследований. Автор приводит свое объяснение наблюдаемых эффектов, а также делает логичную попытку объяснения их зависимости от условий культивирования с учетом уже известных механизмов регуляции функциональной активности мезенхимальных стромальных и эндотелиальных клеток.

Все разделы главы наглядно проиллюстрированы таблицами, графиками и микрофотографиями.

Текст диссертации завершается разделом «Заключение», где подводится основной итог проведенного исследования.

Выводы диссертации соответствуют полученным результатам и задачам исследования.

В целом, работа выполнена на высоком уровне с использованием современных методов молекулярной и клеточной биологии. Основные результаты диссертационной работы О.В. Жидковой представлены в 11 печатных работах, 3 из которых опубликованы в журналах, рекомендованных ВАК РФ для публикаций материалов докторских и кандидатских диссертаций, 1 статья - в журналах из базы Web of Science. Материалы диссертационного исследования доложены на 7 конференциях Всероссийского и международного уровня.

Автореферат и публикации в полной мере отражают основные положения диссертации.

Обоснованность и достоверность

Для решения поставленных автором задач использован комплекс современных методов молекулярной и клеточной биологии. Выводы сделаны четко по результатам исследования, полностью подтверждены и аргументированы и логически следуют из результатов, полученных в ходе исследования. Работа изложена четко и последовательно. Личный вклад автора в диссертационную работу не вызывает сомнений.

Замечания по работе

Принципиальных замечаний к работе нет.

Замечания частного характера:

Список использованных сокращений в диссертации страдает некоторой лапидарностью, а в автореферате отсутствует. В тексте диссертации имеются некоторые пунктуационные и стилистические погрешности.

Указанные замечания имеют редакционный характер и не снижают научно-практическую ценность диссертационного исследования.

Заключение

Диссертационная работа Жидковой О.В. «Взаимодействие мезенхимальных стромальных и эндотелиальных клеток в условиях пониженного содержания кислорода и

провоспалительной активации», выполненная под руководством д.м.н., профессора, член-корр. РАН Буравковой Людмилы Борисовны, является научно-квалификационной работой, в которой решена актуальная научная задача: установлены эффекты взаимного влияния мезенхимных стромальных и эндотелиальных клеток человека при действии гипоксии и провоспалительных цитокинов.

Таким образом, диссертация Жидковой О.В. на тему: «Взаимодействие мезенхимальных стромальных и эндотелиальных клеток в условиях пониженного содержания кислорода и провоспалительной активации», представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям 03.03.01 – физиология и 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология, является завершенной научно-квалификационной работой, по актуальности, новизне, теоретической и практической значимости, достоверности полученных результатов соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», а соискатель Жидкова О.В. заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям 03.03.01 – физиология и 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология.

Отзыв обсужден и одобрен на межлабораторном семинаре НИИЭК ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России от 26 октября 2020 г., протокол заседания №.5

Директор НИИЭК
ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России
член-корр. РАН
yerarfyon@mail.ru
тел. (495)-414-67-12



Е.В.Парфенова

Ведущий научный сотрудник
лаборатории ангиогенеза НИИЭК
ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России
д.б.н.
myumensh@mail.ru
(495)-414-67-13

Меньшиков М.Ю