

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических наук Александровской Натальи Андреевны на тему «Стимуляция регенерации кожи с помощью клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток жировой ткани» по специальности 03.01.08 – Биотехнология.

Актуальность темы исследования

Проблема восстановления целостности кожного покрова остается актуальной в медицине уже в течение многих десятилетий. С одной стороны, это связано с высокой частотой встречаемости этого типа нарушений. Это и травмы, и хронические раны (трофические язвы) у больных с критической ишемией нижних конечностей, диабетом, и ожоги.

В онкологии эта проблема также существует вследствие сниженной регенерации тканей после лучевой и химиотерапии. Справедливости ради необходимо в этом аспекте упомянуть и пластических хирургов, у которых образование рубцов расценивается как неблагоприятное событие.

Научные исследования способов восстановления кожных дефектов ведутся уже около ста лет. Вехами на этом пути были работы Медавара (40-е годы) в Лондоне, который получил *in vitro* пласты кератиноцитов. В 70-е годы Дж. Ревальд использовал пласты кератиноцитов для лечения ожогов у животных. Юджин Бея примерно в это же время установил, что фибробласты размножаются в слое коллагена *in vitro*, преобразуя его в подобие клеточного матрикса. К началу 90-х годов удалось сформировать *in vitro* аналог кожи – так называемый «кожный эквивалент», который состоял из слоя кератиноцитов, под которым были фибробласты в геле. Эквивалент был армирован пластмассовой сеткой («сетчатым эндопротезом»).

Первая проблема, с которой столкнулись исследователи - происходило разрушение кожного эквивалента в агрессивной раневой среде. Одним из путей преодоления стало усиление конструкции сшивающими агентами и полимерами. Кроме того, были разработаны технологии получения многослойных пластов кератиноцитов – аутографтов. Однако такие конструкции оставались хрупкими, длительно изготавливались, имели высокую стоимость, а главное – легко инфицировались на раневой поверхности. Использование же аллогенных клеток (фибробластов, кератиноцитов) позволяло надеяться только на их трофический эффект – выделение цитокинов, факторов роста и других биологически активных веществ в рану с надеждой стимулировать регенеративные процессы.

Сегодня пластические хирурги золотым стандартом продолжают считать аутодермопластику, сочетая ее, при необходимости, с перфорацией трансплантата для его растяжки с целью увеличения площади.

И, наконец, необходимо упомянуть, что на рынке медицинских изделий имеется ряд коммерческих кожных эквивалентов, рекомендуемых для лечения ожоговых и длительно незаживающих ран. Но органотипического замещения кожных дефектов (т.е. без образования рубцов), равно как и включения компонентов имплантатов в конечную структуру кожи, пока никому добиться не удалось.

С этих позиций тема работы Н.А.Александровской, безусловно, актуальна, и ее практическую значимость трудно переоценить.

Научная новизна результатов исследования и их значимость для науки и практики

В диссертационной работе представлена контролируемая методология формирования тканеинженерной конструкции на основе клеточных пластов из МСК жировой ткани (ЖТ), которая была отработана для МСК мыши, крысы и человека. Доказан синтез компонентов

внеклеточного матрикса (ВКМ) в пластах и спонтанное упорядочивание его структуры *in vitro*.

Исследование секретомного и транскриптомного профиля МСК в пластах позволило автору сформулировать новые механизмы ранозаживляющего эффекта клеточных пластов МСК на модели пролежневой раны – эффекта, заключающегося в органотопическом восстановлении тканей без рубца, включая регенерацию волосяных фолликулов. Эти данные являются принципиально новыми, не имеющими аналогов в мировой литературе, и, безусловно, открывают дальнейшие перспективы настоящей работы.

Практическая значимость проведенного исследования и его результатов также не вызывает сомнений и определяется проблемой заживления трофических язв, пролежней, операционных ран у онкологических больных после лучевой и химиотерапии.

Научная новизна и значимость диссертационного исследования Н.А.Александровской подтверждена 15 публикациями, в том числе 4 статьями в журналах из базы данных Scopus и Web of Science, в том числе 2 статьями в журналах первой квартили – Q1. Опубликованные научные работы полностью отражают содержание диссертационного исследования Н.А. Александровской.

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

Результаты исследования, выводы, практические рекомендации и положения, вынесенные на защиту, обоснованы большим количеством корректно выполненных экспериментальных исследований и адекватной статистической обработкой результатов. В диссертационной работе использованы современные методы исследования, включая культуральные методы, *in vivo* модели раны у животных (механического и пролежневого генеза), инвертированную и люминесцентную микроскопию, гистологические методы, иммуногистохимические методы и

иммуноферментный анализ, секретомный анализ и транскриптомный анализ МСК в пластах и суспензии. Работа содержит значительное количество иллюстративного материала, расчетные данные, а также сопоставление собственных результатов с данными других авторов, что позволяет считать выполненные экспериментальные исследования новыми и достоверными.

Оценка содержания и завершенности диссертации

Диссертация Н.А.Александровской выполнена в соответствии с требованиями ВАК РФ ГОСТ Р 7.0.11.-2011, написана в классическом стиле и состоит из введения, списка сокращений, обзора литературы, глав «Материалы и методы», «Результаты собственного исследования и их обсуждение», заключения, выводов и списка литературы, включающего 181 источник (2 отечественных и 179 зарубежных). Диссертация изложена на 102 страницах машинописного текста, иллюстрирована 21 рисунком.

Во введении автор обосновывает актуальность своего исследования, его научную новизну и практическую значимость, формулирует цель и задачи работы. По данному разделу принципиальных замечаний нет.

Глава 1. «Обзор литературы», объем 31 страница, состоит из 3 подразделов.

В первом разделе изложены основные принципы восстановления поврежденной ткани. Во втором – систематизированы данные литературы, касающиеся характеристики МСК, механизмов их терапевтического действия и роли стромы, образуемой МСК, в механизмах их терапевтического действия. В третьем разделе обзора систематизированы данные, касающиеся секретомы МСК и взаимосвязанных с ним терапевтических эффектов МСК и информация об исследовании клеточных пластов. Обзор литературы полностью обрисовывает состояние в мире по теме диссертации, обосновывает цель и задачи исследования диссертанта.

Замечание к разделу: рис.2 из «Обзора литературы» и рис. 17 из раздела «Собственные результаты» идентичны.

Глава 2. «Материалы и методы». В этом разделе достаточно полно изложены препаративные методы, методы культуральной работы, микроскопии, модели ран у животных, методы молекулярной биологии и использованные реактивы, что позволяет воспроизвести эксперименты. Методы адекватны поставленным задачам. Замечаний к этому разделу нет.

Глава 3. «Результаты и их обсуждение». Прежде всего хотелось бы отметить, что работа выполнена на высоком методическом уровне. Прослеживается научная логика в этапности постановки экспериментов. Для автора характерна научная честность в изложении негативных результатов и обсуждении данных. Работа написана хорошим языком и очень аккуратно оформлена. В сочетании с логичностью и достоверностью экспериментов на каждом ее этапе, данную работу в целом я бы охарактеризовала как добротную. Глава состоит из 4-х разделов, в которых логично описаны этапы работы:

- оптимизация методики получения клеточных пластов МСК, что позволило автору получать за сравнительно короткий срок (7 дней) легко снимаемые пласты заданной площади;
- гистологическая характеристика клеточных пластов из МСК, включая идентификацию белков ВКМ в процессе его формирования и упорядочивания;
- методика трансплантации клеточных пластов/суспензии МСК в шинированную кожную рану; автором доказано, что МСК в пластах дольше сохраняются в ране (21 день vs 14 дней), и способствуют сокращению сроков её заживления за счет ускорения созревания грануляционной ткани.

Наиболее интересные и важные с научной точки зрения результаты получены на модели пролежневого дефекта. Так, Н.А. Александровской показано, что, как и на модели острой механической травмы кожи,

клеточные пласты МСК ускоряют заживление, включая эпителизацию, образование и созревание грануляционной ткани, но без формирования рубца, и дополнительно – с регенерацией волосяных луковиц. Автором, кроме того, на этой модели доказано, что МСК в пластах снижают (в сравнении с суспензией МСК) плотность капилляров в формирующейся дерме, но увеличивают плотность более крупных стабилизированных сосудов. В то же время МСК в пролежневом дефекте сохраняется лишь 3 суток.

На заключительном этапе работы Наталья Андреевна исследовала молекулярные механизмы регенеративного эффекта МСК в пластах, анализируя в сравнительном аспекте секретом и транскриптом МСК в пластах и в суспензии. Безусловно, этот раздел является научным украшением работы, и подводит базис под полученные различия в регенеративных эффектах МСК в суспензии и в пластах. Самый сильный результат этого раздела — это то, что МСК в пластах секретируют ансамбль факторов, стабилизирующих кровеносные сосуды, но не стимулирующих неоангиогенез.

Замечания к разделу «Собственные результаты»

1. Целесообразно было бы фотографии гистологических препаратов, по крайней мере в диссертации, сделать крупнее и с большим увеличением, а может быть сделать и серийные срезы. Это позволило бы точно установить, происходит ли восстановление волосяных луковиц с краев дефекта или по всей площади дефекта. Кроме того, доказательства отсутствия рубца в зоне дефекта стали бы более весомыми. На представленных фото в диссертации и автореферате не отмечено, с какими увеличениями работала автор.
2. Целесообразно было бы отдельно представить и описать эпителизацию и восстановление дермы в динамике.

Замечания носят частный характер и не умаляют значимости диссертационной работы.

Вопросы по разделу «Собственные результаты»

Вопросы оппонента обусловлены исключительно интересом к работе и перспективам дальнейших исследований.

1. В экспериментах на модели *in vivo* уходит ли пласт МСК вместе с фибриновым струпом или остается в ране?
2. Как по времени соотносились эпителизация раны и формирование дермы?
3. Отличаются ли, по мнению автора, «регенераторные импульсы» от МСК в случае глубокой механической и пролежневой ран?
4. Хотелось бы знать мнение автора, почему МСК в пластах стимулирует регенерацию механической раны с образованием рубца, а пролежневой раны – без рубца.
5. Чем объясняется тот факт, что МСК в пластах в механической ране сохраняются 21 день, а в пролежневой - только 3 суток?

Соответствие содержания автореферата основным положениям диссертации

Автореферат оформлен в соответствии с требованиями, предъявляемыми к авторефератам, в кратком изложении содержит все основные результаты диссертационной работы. Автореферат полностью соответствует содержанию диссертации. Принципиальных замечаний по работе нет.

Заключение

Диссертационная работа Александрушкиной Натальи Андреевны «Стимуляция регенерации кожи с помощью клеточных пластов из мезенхимных стромальных клеток жировой ткани» полностью отвечает требованиям, установленным Московским Государственным Университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Диссертация является законченным научным исследованием, имеющим несомненную научную и практическую значимость. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 03.01.08 –

«Биоинженерия» (по биологическим наукам), а также критериям, определенным пп.2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском Государственном Университете имени М.В. Ломоносова, а также оформлена согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского Государственного Университета имени М.В. Ломоносова.

Таким образом, соискатель Наталья Андреевна Александровская заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.08 – «Биоинженерия».

Доктор биологических наук, профессор,
заведующая отделением Прогноза
эффективности консервативной
терапии опухолей МНИОИ им П.А.Герцена –
филиала ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава
России



Сергеева Н.С.

29 марта 2022г.

Контактные данные:

Тел.: +7 (495) 945-74-15

Моб.: +7-903-590-08-95

E-mail: prognoz.01@mail.ru

Специальность 14.00.14 - онкология

«Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена – филиал Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства Здравоохранения Российской Федерации.

Юридический адрес: 249036, Калужская обл., г.Обнинск, ул.Королева, д.4

Фактический адрес: 125284, г. Москва, 2-ой Боткинский пр., д. 3

Тел: +7(495)945-19-35; e-mail: mnioi@mail.ru

Подпись д.б.н., проф. Н.С. Сергеевой «ЗАВЕРЯЮ»

Ученый секретарь
ФГБУ «НМИЦ радиологии»
Минздрава России



Жарова Е.П.

29 марта 2022г.