

## ОТЗЫВ

**официального оппонента на диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических наук Бабенко Валентины Андреевны на тему «Роль межклеточной передачи митохондрий в реализации нейропротекторного действия мезенхимальных мультипотентных стромальных клеток» по специальности 03.03.04 – «клеточная биология, цитология, гистология»**

Диссертация Валентины Андреевны Бабенко посвящена крайне актуальной проблеме – исследованию механизмов влияния мезенхимных стромальных клеток на клетки нейрального происхождения. Применение клеточной терапии для лечения ряда заболеваний предполагает трансплантацию клеток (прежде всего именно ММСК) реципиенту. Во многих клинических исследованиях отмечается положительный эффект аллогенной трансплантации в терапии таких заболеваний, как инсульты, нейродегенеративные заболевания, язвенные колиты, поражения печени, сетчатки и многие другие. Данный эффект может быть обусловлен как дифференцировкой ММСК в клетки поврежденной ткани, так и секрецией ими биологически активных веществ и мембранных везикул – экзосом. *In vitro* мезенхимные стромальные клетки способны дифференцироваться в клеточные элементы костной, хрящевой, жировой и нервной тканей. Однако при трансплантации ММСК в поврежденные области их дифференцировка в клетки соответствующих тканей остается во многом спорной. Основное влияние, как принято считать в настоящее время, ММСК оказывают посредством секреторной активности и образования экзосом. Однако в 2006 г был описан новый способ взаимодействия клеток – туннельные нанотрубки (ТНТ). В начале возможность формирования таких контактов вызывала большое недоверие. Однако в настоящее время показано существование разных вариантов ТНТ, различающихся по способу контакта (слияние цитоплазмы или близкий контакт мембран), присутствию различных

элементов цитоскелета, возможностью транспорта органелл (митохондрий, ЭПР, везикул кислого компартмента) между клетками. ММСК являются одним из типов клеток для которых характерно формирование ТНТ. Однако до сих пор этот вид контактов остается широким полем для исследований. Не ясно, что стимулирует образование ТНТ, идет ли передача компонентов цитоплазмы в одном или двух направлениях. Как наличие такого типа контактов влияет на свойства клеток.

Диссертация Бабенко В.А. написана по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения и заключения. Текст диссертации изложен на 185 стр., иллюстрирован 31 рис. Список литературы включает 444 источника.

Большой по объему обзор литературы (70 стр.) посвящен трем главным областям клеточной биологии, попавших в фокус исследования – роли дисфункции митохондрий в невропатологических заболеваниях, особенностям применения ММСК в клеточной терапии и известным на сегодняшний день механизмам их действия, в т.ч. ТНТ. Обзор литературы плавно подводит читателя к постановке задач данного исследования.

Раздел «Материалы и методы» написан достаточно подробно. Для достижения поставленных задач автор использовала широкий арсенал методов клеточной и молекулярной биологии. Особенно интересно, что исследование влияния ММСК на клетки нейрального происхождения проводилась не только на модели культуры клеток, но и *in vivo* с применением гистологической техники. Перед тем, как приступить к постановке экспериментов была проведена тщательная верификация культур ММСК, нейральных клеток и астроцитов.

Принципиально новыми и вносящими вклад в развитие клеточной биологии являются следующие положения диссертации Бабенко В.А. Продемонстрирован нейропротекторный эффект ММСК при лечении экспериментального ишемического инсульта. Показана передача компонентов цитоплазмы между ММСК и нейральными клетками. Продемонстрирована роль малой ГТФ-азы Miro1 в транспорте митохондрий по ТНТ. Особо хочется отметить примененные подходы (кислородно-глюкозную депривацию, использование культуры с поврежденной мтДНК), которые позволил автору убедительно доказать, что именно повреждение митохондрий стимулирует их перемещение из клеток-доноров в клетки-реципиенты, что и способствует выживанию поврежденных клеток.

В целом результаты, полученные Бабенко В. А. являются важными и крайне интересными. Положения, выносимые на защиту обоснованы и соответствуют результатам исследования. В автореферате автор достаточно полно отразила основные результаты выполненного исследования.

Однако хочется высказать несколько замечаний. Одним из доказательств межклеточного транспорта компонентов цитозоля является выявление флуоресцентных зондов на основе Calcein методом проточной цитофлуориметрии. Однако из работы не вполне понятно в каких именно компонентах цитоплазмы накапливается кальцеин – в цитозоле или в мембранных органеллах. На рис. 10 видно, что кальцеин неравномерно распределен в цитозоле, а находится и в цитозоле и в составе гранул – возможно мембранных органелл. Встает вопрос – между клетками происходит передача цитозольного кальцеина или кальцеина в составе мембранных органелл? И что именно вызывает повышение продукции нейротрофических факторов в ММСК?

Так же хотелось бы выяснить, почему при сокультивировании ММСК, меченых кальцеином с нейральными клетками происходит падение

интенсивности флуоресценции ММСК (рис.8) , а при сокультивировании с астроцитами этого не наблюдается. Можно ли предположить, что воздействие нейральных клеток включает какие-то механизмы, способствующие удалению кальцеина из ММСК (например активацию множественной лекарственной устойчивости).

Крайне интересными являются данные о передаче митохондрий по ТНТ от ММСК к нейральным клеткам. Представленные фотографии полученные с помощью конфокального микроскопа не вызывают сомнений в том, что митохондрии находятся в составе ТНТ. Однако хотелось бы, чтобы эти данные были подтверждены методом просвечивающей электронной микроскопии. Это бы позволило выявить наличие слияния клеток в месте контакта и оценить состояние транспортируемых митохондрий. Подобный эксперимент был бы интересным дополнением к проделанной работе. Однако целью исследования не являлась характеристика ТНТ, так что данное замечание не ставит под сомнение полученные автором данные о перемещении митохондрий.

**Заключение.** Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 03.03.04 – «клеточная биология, цитология, гистология» (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 Бабенко Валентина Андреевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – «клеточная биология, цитология, гистология».

**Официальный оппонент:**

кандидат биологических наук,  
доцент кафедры клеточной биологии  
и гистологии биологического факультета  
ФГБОУ ВО «Московский государственный  
университет имени М.В. Ломоносова»

Кисурина-Евгеньева Ольга Петровна



04.05.2018

**Контактные данные:**

тел.:

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена  
диссертация: 03.03.04-клеточная биология, цитология, гистология

**Адрес места работы:**

119991, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12  
ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени  
М.В. Ломоносова», биологический факультет  
Тел.: +7 (495) 939-17-94, e-mail: [onishchenko@bio.msu.ru](mailto:onishchenko@bio.msu.ru)

Подпись сотрудника биологического факультета  
ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени  
М.В. Ломоносова» Кисуриной-Евгеньевой О.П. удостоверяю

Декан биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова,  
академик РАН,  
М.П. Кирпичников



11.05.18