

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Новоселецкой Екатерины Сергеевны на тему “Выяснение роли мезенхимных стромальных клеток в регуляции направленной дифференцировки и перепрограммирования стволовых клеток“, представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности

03.01.08 -Биоинженерия

Тканевая инженерия является одним из приоритетных направлений современной биомедицины. Одним из компонентов тканевой медицины являются новые клеточные технологии, которые позволяют обеспечить регенерацию как отдельных тканей, так и в недалеком будущем целых органов. При этом, как известно, ключевая роль в тканевой инженерии отводится стволовым клеткам. В процессе поддержания функций стволовых клеток важную роль играет ниша стволовой клетки, главными компонентами которой являются внеклеточный матрикс (ВКМ), нейроэндокринные сигналы и низкомолекулярные факторы, а также поддерживающие клетки, формирующие микроокружение для стволовых клеток и секретирующие различные регуляторные факторы. Известно, что ВКМ регулирует жизнеспособность и ключевые функции клеток, в частности такие, как миграция, пролиферация и дифференцировка клеток. Кроме того значительная роль ВКМ уже доказана в патогенезе различных заболеваний, в процессе старения, а также для поддержания стволовых клеток. В связи с очень быстрым развитием тканевой инженерии в последние 10-15 лет, выяснение фундаментальных вопросов, связанных с механизмами дифференцировки стволовых клеток и ролью ВМК в этих процессах, приобретают особую значимость.

Целью данной работы является выяснение механизмов регуляции дифференцировки стволовых клеток внеклеточным матриксом,

продуцируемым мезенхимными стромальными клетками человека (МСК).

Таким образом, **актуальность** представленной работы несомненна.

Научная новизна данной работы заключается в том, что автором впервые предложен подход с применением децеллюляризованного ВКМ (дВКМ), полученного из клеточных пластов МСК человека, с целью модуляции ответа стволовых и прогениторных клеток на стимулы дифференцировки. Автором разработан и оптимизирован протокол для получения дВКМ, а также обнаружена способность дВКМ стимулировать пролиферацию и дифференцировку стволовых клеток на ранних сроках индукции дифференцировки. Кроме того показано, что это происходит за счет обогащения пула прогениторных клеток и их перепрограммирования в активное состояние готовности к индуцирующим сигналам (компетентность). Определены особенности изменения активности ключевых участников различных внутриклеточных сигнальных путей в МСК человека при культивировании на дВКМ. Впервые установлена способность дВКМ ускорять регенерацию костной ткани после повреждения в модели на крысах.

Таким образом, **научная новизна** диссертации совершенно очевидна.

Научно-практическая значимость связана с тем, что в диссертации разработаны новые оригинальные подходы, которые в будущем могут найти применение для моделирования различных ниш тканеспецифичных стволовых клеток *in vitro*, а также в тканевой инженерии и регенеративной медицине, в частности, для функционализации различных биоматериалов (скаффолдов).

Общая характеристика диссертационной работы

Работа выполнена на Кафедре биохимии и молекулярной медицины Факультета фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова.

Диссертация имеет традиционную структуру и состоит из Введения, Литературного обзора, главы Материалы и Методы, главы Результаты, главы Обсуждение результатов, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 144 страницах, содержит 1 таблицу, 28 рисунков. Библиография включает 351 источник.

Глава 1 (Литературный обзор) состоит из трех разделов :

1.1 Стволовые клетки и ниша стволовой клетки.

В этом разделе подробно рассмотрены классификация стволовых клеток (1.1.1), активация стволовых клеток (1.1.2), перепрограммирование стволовых клеток (1.1.3). Кроме того обстоятельно описана ниша стволовой клетки (1.1.4), а также дифференцировка МСК как постнатальных стволовых клеток в регенерации тканей и дифференцировке постнатальных стволовых клеток (1.1.5).

1.2 ВКМ как компонент ниши стволовой клетки.

В этом разделе автор рассматривает основные компоненты внеклеточного матрикса (1.2.1), различные компоненты ВКМ как сигнальные молекулы (1.2.2), влияние ВКМ на дифференцировку стволовых клеток (1.2.3).

1.3 Внутриклеточный сигналинг от ВКМ.

В данном разделе подробно рассмотрены некоторые молекулы (вещества), участвующие в распознавании компонентов ВКМ, в частности такие, как интегрины и интегриновые адгезионные комплексы (ИАК) (1.3.1); описывается консенсусный адгесом (1.3.2); механо-чувствительность стволовых клеток (1.3.3).

1.4 Моделирование микроокружения клеток с помощью ВКМ и его компонентов.

Представленный автором Литобзор хорошо структурирован, очень грамотно и логично написан, содержит достаточно подробную информацию и дает полное представление о современном состоянии

проблемы за последние 5 лет. Список литературы впечатляет как по количеству ссылок (351 источник), так и по их качеству. Так, из 351 приведенных автором ссылок 157 источников (прибл. 45 % от общего количества) относятся к периоду 2016-2021 гг. Этот факт может свидетельствовать о широком кругозоре автора, а также его умении и желании работать с литературой.

В Главе 2 (Материалы и Методы) достаточно полно описаны реактивы и реагенты, клетки, а также все использованные в работе методы, в частности, приведены подробные протоколы для получения и характеристики дВКМ. Кроме того описаны метод оценки цитотоксичности дВКМ *in vitro*; изучение влияния дВКМ на свойства МСК человека; исследование активации участников внутриклеточных сигнальных путей МСК при культивировании на дВКМ; экспериментальные животные и модель монокортикального диафизарного дефекта бедренной кости крысы; анализ клеточного состава с помощью морфометрии и иммуногистохимического анализа клеточного состава костной ткани; статистический анализ.

Результаты работы представлены в **Главе 3**. В этой Главе содержится 8 подглав :

3.1 Получение и характеристика дВКМ, продуцируемого МСК жировой ткани человека.

3.2 Децеллюлялизированный ВКМ обеспечивает адгезию и пролиферацию МСК.

3.3 Децеллюлялизированный ВКМ модулирует дифференцировку ТНР-1 в макрофаги.

3.4 Децеллюлялизированный ВКМ стимулирует пролиферацию прогениторных клеток.

3.5. Децеллюлялизированный ВКМ стимулирует индуцированную дифференцировку мультипотентных стволовых МСК.

3.6 Адгезия к дВКМ модулирует активность специфичных внутриклеточных сигнальных путей в первично выделенных МСК.

3.7 Децеллюляризованный ВКМ поддерживает дифференцировку МСК через Src-PI3K-AKT-зависимый внутриклеточный сигнальный путь.

3.8 Взаимодействие МСК с дВКМ через интегрины вносит существенный вклад в регуляцию дифференцировки клеток.

В целом, **Глава Результаты** очень грамотно структурирована, логично написана и прекрасно проиллюстрирована цветными рисунками и микрофотографиями. **Глава Результаты** и **Глава Обсуждение результатов** позволяют получить полное представление о большом количестве проведенных автором экспериментов и тщательном анализе результатов. Таким образом, безусловной заслугой автора являются безупречная логика, аккуратность и последовательность в планировании и проведении экспериментов, а также тщательное обсуждение полученных результатов.

Степень достоверности полученных результатов. Исследование выполнено на высоком научном и методическом уровне с применением самых современных методов исследования. Диссертационная работа включает подробное описание использованных методик, для обработки экспериментальных данных использованы методы математической статистики.

Выводы диссертации сформулированы четко и логически вытекают из материалов проведенного исследования.

Основные результаты диссертации опубликованы в 20 статьях, в том числе в списке публикаций имеется статья в очень достойном международном журнале *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (IF 5.18 WoS, Q1) и одна статья в *Biochemistry (Moscow)* (IF 1.98 WoS). Кроме того, по результатам работы был оформлен патент РФ №2718907. В списке тезисов конференций содержится 15 наименований.

Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

При прочтении диссертации возникло несколько комментариев и вопросов, в частности следующие :

1. В работе использовали два RGD-пептида, один из которых был линейным коммерческим (ab142698 Abcam, США), другой был получен из ИБХ и представлял собой циклический пептид, в котором также была RGD- последовательность, но он был циклическим, а не линейным, при этом был еще дополнительно модифицирован с помощью TPP. Из работы непонятна ни точная структура пептида, ни что такое TPP, ни чем этот пептид отличался от линейного RGD-пептида.

2. В оглавлении к диссертации сбилась нумерация (см Глава Результаты, где после 3.5 опять идет 3.4; 3.5 и т.д.).

3. Автором очень небрежно оформлен список литературы. Так, очень много ссылок на статьи, в которых отсутствуют том, номер, страницы. В ссылке [3] отсутствует даже название журнала (Journal of Biotechnology and Bioprocessing, v 2 (1), p71-7). В ссылке [95] большими буквами набрано название статьи. Список собственных публикаций в автореферате также оформлен небрежно. Так, в статье, напечатанной в журнале Frontiers in Cell and Developmental Biology, отсутствуют том, номер, страницы. В ссылке на патент не совсем понятно, к чему относится дата 15 апреля 2020 г. Это дата приоритета при подаче заявки на патент или дата выхода Бюллетеня, в котором этот патент?

4. В диссертации есть опечатки, несогласования и неудачные выражения. Так, см на стр 20 (в случае скелетных мышцах), стр.73 (на проточной цитофдуориметре), стр. 75 (иммуноферментный анализ позволили), стр. 81 (площадь каждой клетки был), стр. 91 (это было выражалось), стр. 106 (растворимый адсорбированный на пластик фибронектин), на Рис 27 в подписи оси X (время выведения).

5. Неправильно подписаны практически все фотографии. Так, для фотографий с электронного микроскопа в подписи не нужно писать

увеличение (см. например, рис. 11), а достаточно размерной шкалы, которая дана в нижнем правом углу внутри каждой фотографии. Для фотографий с оптического микроскопа правильно писать не увеличение объектива (см., например, рис 8), а общее увеличение (увеличение объектива $\times$ увеличение окуляра). При этом рисовать шкалу в правом нижнем углу каждой фотографии не нужно (см рис 12). Таким образом, для фотографий с электронного микроскопа приводят размерную шкалу внутри фотографий, а для снимков с оптического микроскопа дают общее увеличение в подписи к рисунку.

6. Название клеток дано в двух вариантах : hTERT-MCK (в большинстве случаев) и hTERT-MSCs (см стр.103).

Однако все вопросы и замечания не являются принципиальными и носят характер пожеланий на будущее, а количество обнаруженных опечаток и ошибок для такого объемного текста диссертации (144 страницы) не очень велико.

В целом как диссертационная работа, так и автореферат Новоселецкой Е.С. написаны грамотно, прекрасно проиллюстрированы большим количеством фотографий, цветных рисунков и оставляют самое приятное впечатление от чтения данной работы.

Из диссертации следует, что автором выполнен очень большой объем комплексных исследований с применением самых современных физико-химических методов.

Таким образом, диссертация Новоселецкой Е.С. отвечает всем требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 03.01.08–Биоинженерия (по биологическим наукам), а также критериям, определяемым пп. 2.1-2.5. Положения о присуждении учёных степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова,

оформлена согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, а соискатель Екатерина Сергеевна Новоселецкая заслуживает присуждения ей учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.08–Биоинженерия.

Главный научный сотрудник,
Руководитель Лаборатории биомедицинских
материалов
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

117 997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10
Тел 8(495) 336 06 00;
email :lemarkv@hotmail.com

доктор химических наук



Марквичева Елена Арнольдовна

Подпись д.х.н. Марквичевой Е.А.

ЗАВЕРЯЮ

Учёный секретарь ИБХ РАН

доктор физико-математических наук

Олейников В.А.



02.09.2021