

## **ОТЗЫВ**

**официального оппонента на диссертацию Васютина Игоря Алексеевича на тему «Изучение гистогенетической принадлежности клеток, выделенных из мочи, и перспективы их применения в тканевой инженерии» на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология**

### **Актуальность темы исследования**

Появлением в регенеративной медицине понятия тканевая инженерия мы во многом обязаны пионерским исследованиям группе Энтони Аталы из Wake Forest Institute of Regenerative Medicine, посвященным восстановлению уретры с помощью искусственно созданных конструкторов на основе коллагенового геля. Эти исследования по восстановлению самых простых полых органов послужили основой для разработки современных методов создания тканеинженерных паренхиматозных органов на основе децеллюляризированных стромальных скаффолдов лёгкого, печени, почки. Актуальность создания биоэквивалентов паренхиматозных органов очень высока, поскольку дефицит донорских органов существует перманентно. Вместе с тем, несмотря на прошедшие тридцать лет с момента первых публикаций по созданию искусственной уретры, актуальность развития и внедрения этих технологий в урологии по-прежнему огромна.

Одной из краеугольных задач тканевой инженерии является поиск безопасного и воспроизводимого источника стволовых клеток. С учётом развития технологий индуцированной плюрипотентности и прямого репрограммирования, такими источниками в настоящее время могут быть практически любые соматические клетки, имеющие ядро: мононуклеары костного мозга, дермальные фибробласты, хондроциты, клетки слизистых оболочек, миобласты, клетки дентальной пульпы, жировой ткани и пр. Исследования того же Wake Forest Institute of Regenerative Medicine показали, что даже в моче здоровых взрослых людей содержится небольшая популяция мультипотентных клеток с высоким пролиферативным потенциалом, названных стволовыми клетками, выделенными из мочи, или стволовыми клетками мочи (СКМ). Учитывая простоту и неинвазивный характер

получения практически неограниченного количества этих клеток, этот источник, несмотря на его некоторую нетривиальность, выглядит крайне привлекательно для решения задач тканевой инженерии урогенитального тракта.

Крайне интересным и до конца не решённым является вопрос гистогенетического происхождения СКМ. В первичной культуре СКМ присутствуют как клетки, экспрессирующие маркеры МСК, так и прогениторные эпителиальные клетки, а также, по данным новейшего обзора, перициты, клетки проксимальных и дистальных канальцев и даже эндотелиальные клетки (PMS7140531).

Диссертация Игоря Алексеевича Васютина задумана и исполнена именно для решения обозначенных выше научных проблем – исследования вопросов тканеинженерного применения СКМ и изучению их гистогенеза. Таким образом, данное диссертационное исследование характеризуется высокой актуальностью.

#### **Степень обоснованности научных положений и выводов, достоверность полученных результатов**

Достоверность и обоснованность полученных в диссертации результатов не вызывает сомнений, поскольку методологически диссертация хорошо выверена, объем экспериментального материала достаточен, обработка данных и статистический анализ полученных результатов выполнены на хорошем уровне.

#### **Научная новизны исследования**

Научная новизна работы заключается в том, что впервые с помощью компьютерного анализа показана идентичность профилей экспрессии поверхностных маркеров камбиальных элементов нефрона у клеток капсулы Шумлянско-Боумана и проксимальных канальцев и у полученных автором СКМ. Также, с помощью компьютерного анализа впервые получены точные количественные данные внутриклеточного содержания маркеров клеток переходного эпителия и ГМК.

#### **Значимость для науки и практики**

Полученные в работе результаты, несомненно, вносят вклад в проблему фундаментальных и прикладных исследований СКМ. Несмотря на то, что

автором не показана дифференцировка СКМ в клетки переходного эпителия в присутствии высокой концентрации EGF, что, действительно, противоречит существующим представлениям о мультипотентности СКМ, автором разработаны протоколы выделения, культивирования и дифференцировки пролиферирующих клеток из нормальной мочи. Также автором проведены исследования по длительному культивированию СКМ на коллагеновом скаффолде, что, безусловно, является практическим вкладом в развитие в России тканевой инженерии.

### **Объем и структура диссертации**

Диссертация построена традиционно и состоит из Введения, формулировки цели и задач, Научной новизны, Положений, выносимых на защиту, Обзора литературы, главы «Материалы и методы», главы «Результаты», Заключение, Выводов и списка цитируемой литературы, включающего ссылки на 141 отечественный и зарубежный источник. Диссертация изложена на 114 страницах машинописного текста, содержит 14 таблиц и проиллюстрирована 21 рисунком.

### **Полнота изложения материалов диссертации в опубликованных работах**

По теме диссертации опубликовано 6 научных работ, из них 5 опубликованы в журналах, включенных в перечень Высшей аттестационной комиссии при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации и рекомендуемых для публикации материалов диссертации на соискание ученой степени доктора и кандидата наук, в том числе 5 статей в международных библиографических базах SCOPUS, Web of Science.

### **Вопросы и замечания**

Диссертация в целом производит благоприятное впечатление. На фоне достаточно высокого качества проведенных исследований, основной формальной претензией к этой работе является то, что автор, по сути не решил основной задачи №4 — разработать способ дифференцировки из СКМ эпителиальных клеток нижних мочевых путей. Не решив ключевую с точки зрения тканевой инженерии задачу, автору пришлось поставить во главу угла исследования гистогенетического типа стволовых клеток мочи. Надо сказать,

что этой цели работа достигла, однако, как всегда, от интересных исследований хочется большего. Возможно, автору следовало поэкспериментировать с протоколами дифференцировки СКМ в эпителиальном направлении. Надо сказать, что успешных примеров эпителиальной трансдифференцировки СКМ взрослого человека в урогенитальный эпителий *in vitro* в системе 2D я не нашёл, хотя первичные эпителиальные культуры из мочи получают очень давно. Так, Felix J.S. ещё в 1980-х годах описал получение цитокератин-позитивных эпителиоцитов из мочи новорожденных (DOI: 10.1007/BF02619424). Описано получение из СКМ пан-цитокератин позитивных уротелиоцитов и гладко-мышечных клеток (ГКМ), что подтверждает их мультипотентность, однако, эта работа сделана на клетках крысы и при культивировании в 3D (PMC6127250). Из более экзотического, описано получение из СКМ эндотелиальных клеток (PMC6127250), остеобластов (PMC4417282), и даже iPSCs (PMC7140531). Таким образом, получение из СКМ эпителиальных прогениторов возможно, как минимум через стадию индуцированной плюрипотентности.

Помимо вариаций с протоколом дифференцировки, на мой взгляд, автор уделил недостаточное внимание исследованию гетерогенности СКМ. Сразу хочу парировать возможный довод о «стволовости» получаемых клонов клеток, поскольку, как я уже упоминал, в современной клеточной биологии не является проблемой ни трансдифференцировка, ни дедифференцировка в мультипотентное состояние. Рискну предположить, что автору удалось получить и «раскультивировать» лишь клоны самого простого типа перевиваемых клеток из СКМ – мезенхимальных стромальных клеток (МСК), кстати, их гистогенез, как раз, наиболее вероятно – из стромы капсулы Шумлянско-Боумана. Другие, более сложные субпопуляции медленно пролиферирующих клеток эпителиального происхождения попросту были вытеснены быстро делящимися МСК. Повторюсь, это лишь предположение и, скорее всего, получение гомогенных эпителиальных прогениторов из мочи без помощи индуцированной трансдифференцировки технически не оправдано. Данное замечание является вопросом дизайна исследования и предметом для дискуссии, поэтому предлагаю его не засчитывать в минус диссертанту, а обсудить в прениях.

Далее следуют вопросы и замечания, непосредственно к материалу, представленному в диссертации.

1. Вопрос относительно выбора цели исследования. С учётом развития технологий клеточного репрограммирования, при которых эпителиальные прогениторы достаточно легко могут быть получены практически из любого типа клеток (например, из дермальных фибробластов), по завершении диссертационного исследования, автор по прежнему считает, что моча — наиболее перспективный источник клеток для тканевой инженерии?
2. Научная новизна. К сожалению, формулировки этого раздела недостаточно чёткие. В научной новизне не следовало упоминать иммуноцитохимическое окрашивание, разработанное до рождения автора. Следовало бы также убрать из научной новизны вот эту фразу: «Также в данной работе получены данные о возможности СКМ дифференцироваться в клетки переходного эпителия и ГМК», во-первых, потому что она неудачна с точки зрения стиля, а во-вторых, эти возможности дифференцировки СКМ показаны задолго до автора (именно – в качестве «показанной возможности», а не конкретной дифференцировки).
3. Научная новизна. Заявление автора о том, что «СКМ являются эпителиальными по своей природе» противоречит последующим данным о том, что популяция СКМ гетерогенна, способна дифференцироваться в ГМК и экспрессирует мезенхимальные маркеры (CD29 CD73, CD90, CD105).
4. Научная новизна. Заявление о том, что «впервые описана фенотипическая гетерогенность СКМ», без указания конкретных феноменов – неверно, поскольку в принципе о гетерогенности СКМ известно очень давно (для обзора см. PMC7140531).
5. Обзор литературы изложен на 36 страницах и претендует на энциклопедичность. В нём описаны анатомия и гистология мочеиспускательного канала, варианты терапии стриктуры уретры, источники клеток для тканевой инженерии (ЭСК, ИПСК, МСК), проведён обзор натуральных и синтетических биоматериалов,

децеллюляризованных тканей. Обзор написан очень грамотно и сам по себе легко может быть превращён в монографию по тканевой инженерии. Недостатком обзора является то, что проблеме диссертации – стволовым клеткам мочи, отведено всего (!) 4 страницы. Справедливости ради, надо добавить, что разделы, посвященные стволовым клеткам капсулы Шумлянско-Боумана также затрагивают результаты диссертации, но я бы в обзоре более сфокусировался на характеристике СКМ.

6. Материалы и методы. Замечаний нет. Идеальное изложение – можно просто брать и воспроизводить, продолжая исследование проблемы.
7. Результаты. Флюоресцентное иммунофенотипирование проведено только в одном канале для проточной цитометрии и в двух каналах для иммунофлюоресценции (один из которых – ядра, окрашенные Hoechst). Это не позволяет судить о колокализации различных маркеров. Поэтому непонятно — экспрессия цитокератинов и ZO-1 происходит в тех же самых клетках, которые экспрессируют CD73, CD90 и CD29? SSEA4 коэкспрессируется с мезенхимальными маркерами? и т.д.
8. Определение гистогенетической принадлежности проведено на СКМ из мочи одного здорового добровольца, от которого были получены 13 клонов. Можно ли считать этот результат воспроизводимым? (т.е. повторяли ли это исследование на клетках других добровольцев). Или это индивидуальная особенность, обусловленная патологией почек?
9. Непонятно, почему в первичных (недифференцированных культурах) наблюдается экспрессия эпителиальных маркеров – цитокератинов и белка плотных контактов ZO-1, а дифференцировка клеток в промежуточный эпителий не удалась. Возможно, для дифференцировки были выбраны неоптимальные условия или клоны не эпителиального происхождения?
10. Согласно рис. 3.11, как до, так и после проведения эпителиальной дифференцировки в культуре клеток присутствуют позитивные по СК AE1/AE3 и C7 уротелиоциты (до 10%). Как это объяснить?

11. Несмотря на то, что фенотипическая гетерогенность СКМ постулируется в работе, я не обнаружил нигде в результатах в чём конкретно она заключается? Гетерогенность полученных клонов очевидна из рисунков световой и флюоресцентной микроскопии, но грамотного ее описания, на мой взгляд в работе не хватает.
12. Раздел «Обсуждение» в диссертации раздроблен по соответствующим разделам результата. Лично я против такого формата, поскольку наличие полноценной главы «Обсуждение полученных результатов» позволяет выкристаллизовать и осмыслить суть выполненной работы в целом, а не по отдельным фрагментам.
13. Несмотря на перфекционизм, которым наполнена диссертация, не обошлось без аграматизмов. Любимой грамматической ошибкой Игоря Алексеевича является рассогласование родов и падежей. Я насчитал таких не менее 10. Рискну предположить, что это связано с тем, что автор многократно «крутит» одну и ту же фразу, чтобы добиться стилистического совершенства и в итоге останавливается на каком-то промежуточном варианте.

Резюмируя замечания по диссертации Игоря Алексеевича, хочу отметить, что ни одно из них не является строго принципиальным, ставящим под сомнение научно-практическую ценность этой квалификационной работы.

### **Заключение**

Диссертационная работа Васютина Игоря Алексеевича на тему: «Изучение гистогенетической принадлежности клеток, выделенных из мочи, и перспективы их применения в тканевой инженерии», представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология, является законченным научно-квалифицированным трудом, содержащим решение важной научной задачи — определение гистогенетической принадлежности стволовых клеток, выделяемых из мочи и оценка возможности их применения в тканевой инженерии органов нижних мочевых путей. Диссертация не содержит

недостовверных сведений об опубликованных соискателем ученой степени работах, в которых изложены основные научные результаты диссертации и полностью соответствует требованиям п. 16 «Положения о присуждении ученых степеней в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)», утвержденным приказом ректора Сеченовского Университета от 31.01.2020 г. №0094/Р, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, Васютин Игорь Алексеевич, заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология.

Заместитель генерального директора  
по научной работе и медицинским технологиям  
ФГБУ ФНКЦ ФМБА России  
доктор медицинских наук (03.01.04 – биохимия)  
Баклаушев Владимир Павлович

Подпись Баклаушева Владимира Павловича заверяю.

Заместитель исполнительного  
директора по управлению персоналом



Т.М. Ильина

24.02.2021г.

ФГБУ ФНКЦ ФМБА России

Адрес: 115682, г. Москва, Ореховый бульвар д. 28

Телефон: +7 (499) 725-44-40

E-mail: info@fnkc-fmba.ru