

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

Стриктура уретры представляет собой обструктивное поражение мочеиспускательного канала, сопровождающееся поражением со стороны нижних отделов мочевых путей вызывая затруднённое мочеиспускание, дискомфорт и другие значимые проблемы для пациента. Выбор метода лечения зависит от локализации стриктуры, её протяженности, сопутствующей патологии и количества ранее перенесенных операций. В случае поражения значительного участка уретры восполнить нехватку ткани для заместительной уретропластики можно при помощи методов тканевой инженерии путем создания трансплантата необходимого размера с использованием эпителиальных клеток для восстановления непроницаемого барьера между просветом мочеиспускательного канала и нижележащими тканями. Наиболее подходящим источником клеток для тканеинженерного трансплантата для уретропластики является мочевого пузырь, однако биопсия мочевого пузыря представляет собой некомфортное для пациента оперативное вмешательство, требующее общей анестезии, и потенциально сопряженно с осложнениями, поэтому наличие более доступного источника клеток для тканевой инженерии трансплантата для уретропластики значительно упростит процесс создания конструкции.

Одним из альтернативных подходов для получения клеток для тканевой инженерии является дифференцировка аутологичных стволовых клеток. Недавние исследования показали, что нормальная моча здоровых взрослых людей содержит небольшую популяцию «рисоподобных» клеток с высоким пролиферативным, дифференцировочным потенциалом и экспрессией

маркеров мезенхимальных стромальных клеток и прогениторных эпителиальных клеток.

Представленная диссертационная работа Васютиным И.А. актуальна и отвечает на важные вопросы для тканевой инженерии: что представляют собой стволовые клетки, выделенные из мочи, с точки зрения их гистогенетической принадлежности и возможно ли их применение в тканевой инженерии органов нижних мочевых путей.

Степень обоснованности научных положений и выводов, достоверность полученных результатов

Сформулированные диссертантом научные положения хорошо обоснованы. При этом они умело сопоставляются с современными данными соответствующей научной литературы по теме исследования. Благодаря четкой формулировке цели и задач исследования, удалось достичь основной цели.

В работе использованы современные методы, применяемые в биологических исследованиях. Достоверность полученных результатов не вызывают сомнений, в исследование включены 20 культур клонов клеток, выделенных из мочи 6 здоровых добровольцев обоего пола и из 24 образцов мочи, из которых были выделены единичные клетки, давшие рост клеточным культурам своих клонов. В работе были использованы иммуноцитологические методы исследования, методы проточной цитофлуориметрии, флюоресцентной и конфокальной микроскопии, анализ Live/Dead Viability/Cytotoxicity Kit (Thermo Fisher Scientific, США).

Исследования проведены в необходимом объеме, статистический анализ полученных результатов подтверждает их значимость и достоверность. Положения, выносимые на защиту, научно обоснованы, подтверждены полученными результатами, имеют значимый как прикладной, так и фундаментальный характер. По каждой из глав раздела «Результаты и обсуждения» сделаны логичные и обоснованные выводы, которые отвечают на поставленные перед исследователем задачи. Выводы и практические рекомендации сделаны в соответствии с полученными результатами.

Научная новизны исследования

Васютиным И.А. впервые проведена характеристика стволовых клеток мочи с точки зрения их гистологической принадлежности, показано, что стволовых клеток мочи являются эпителиальными по своей природе. Использование поверхностных маркеров, описанных для камбиальных элементов нефрона, показало практически идентичные профили экспрессии данных маркеров у клеток капсулы Шумлянско-Боумана и проксимальных канальцев и у стволовых клеток мочи. Автором впервые описана фенотипическая гетерогенность стволовых клеток мочи, получены данные о возможности стволовых клеток мочи дифференцироваться в клетки переходного эпителия и гладкомышечных клеток. Компьютерный анализ изображений позволил получить точные количественные данные внутриклеточного содержания маркеров клеток переходного эпителия и гладкомышечных клеток.

В процессе выполнения диссертационной работы не было найдено признаков дифференцировки стволовых клеток мочи в клетки переходного эпителия под воздействием высоких концентраций эндотелиального фактора роста EGF, что ставит под сомнение существовавшие ранее представления о потенциальности стволовых клеток мочи.

Показана возможность длительного выживанию и пролиферации стволовых клеток мочи на скаффолде для тканевой инженерии.

Значимость для науки и практики

Результаты данной работы позволяют предположить наличие источника стволовых клеток мочи в организме, а также описывают гистогенетическую принадлежность и фенотипическую гетерогенность стволовых клеток мочи. Большое практическое значение имеет определение того, что полученные данные могут быть фундаментом для дальнейших исследований стволовых клеток мочи как объекта клеточных технологий. Отсутствие признаков дифференцировки стволовых клеток мочи в клетки переходного эпителия под воздействием высокой концентрации

эндотелиального фактора роста EGF диктует необходимость пересмотреть данный подход при дальнейших исследованиях стволовых клеток мочи как источника клеток переходного эпителия в тканевой инженерии нижних мочевыводящих путей. Данные о гистогенетическом происхождении стволовых клеток мочи и их способность к пролиферации на скаффолде на протяжении длительного времени говорят о перспективности данного типа клеток в тканевой инженерии.

Объем и структура диссертации

Диссертация И.А. Васютина изложена в традиционном стиле на 114 страницах машинописного текста, оформлена в соответствии с требованиями ГОСТ и состоит из введения, трех глав (обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение), заключения, выводов, списка литературы, включающего 141 источника, из которых 3 на русском и 138 на английском языке, списка сокращений и условных обозначений. Работа содержит 12 таблиц и 21 рисунок. В тексте рукописи детально и обоснованно изложены все выполненные аспекты работы.

Во введении к диссертационной работе обоснованы актуальность, научная новизна, теоретическая и практическая значимость исследования, а также сформулированы цель и задачи работы, положения, выносимые на защиту, и приведена структура работы.

Обзор литературы представлен в достаточном объеме и написан, как и вся диссертация, хорошим литературным языком. Стиль изложения позволяет получить образное впечатление о современном состоянии темы настоящего диссертационного исследования. Методично изложены сведения о стволовых клетках мочи, исследованиях по тканевой инженерии мочеиспускательного канала и проводимых доклинических исследованиях их в качестве заместительной уретропластике мочеиспускательного канала.

В главе «Материалы и методы» описаны данные 6 доноров мочи, протоколы, согласно которым выполнялось выделение стволовых клеток мочи, культивирование, определение пролиферативной активности,

выделение клеток уротелия и гладкомышечных клеток из кадаверного материала мочевого пузыря, иммуноцитохимическое окрашивание клеток уротелия и гладкомышечных клеток, Дифференцировка стволовых клеток мочи в гладкомышечные клетки, оценка уровня экспрессии маркеров дифференцировки с помощью компьютерного анализа изображений флюоресцентной микроскопии и жизнеспособности стволовых клеток мочи в составе тканеинженерной конструкции. Все вышеперечисленное позволяет воспроизвести выполненные в рамках данной работы эксперименты. Далее в этой главе детально описаны методы, применяемые для статистической обработки полученных результатов.

Глава «Результаты» представлена семью разделами, каждый раздел этой главы заканчивается обсуждением полученных результатов, в котором приводится подробное описание. Обращает на себя внимание безупречная логичность и убеждающая обоснованность интерпретации результатов проведенных исследований.

Первая часть главы «Результаты» посвящена выделению и культивированию стволовых клеток мочи. В ней описано, что количество клонов СКМ в моче крайне мало, методы культивирования позволяют получить с одного образца мочи достаточное количество клеток СКМ для использования в различных целях, в том числе в тканевой инженерии.

Вторая часть этой главы содержит результаты проточной цитометрии и иммуноцитохимические исследования первичной оценки фенотипа стволовых клеток мочи. И.А. Васютиным исследованы различные маркеры различных тканеспецифичных стволовых клеток взрослого организма, включая эпителиальные клетки.

В третьем разделе главы «Результаты» описаны результаты гистогенетической принадлежности стволовых клеток мочи по профилю экспрессии поверхностных маркеров. Диссертант обосновано описывает получение результатов гистогенетической принадлежности стволовых клеток мочи косвенным путем.

Четвертый раздел главы посвящен изучению фенотипа гладкомышечных клеток и клеток уротелия мочевого пузыря в культуре. Автор сравнивает полученные результаты по элементам цитоскелета со структурными составляющими гладкомышечных филаментов α SMA, компоненту цитоскелета мышечных клеток десмин и ассоциированный с мышечными филаментами белка кальпонин с литературными данными.

В пятом разделе главы «Результаты» описаны оценка дифференцировки стволовых клеток мочи в гладкомышечные клетки. Автором показано, что совместное применение факторов в культуре стволовых клеток эффективно приводит к дифференцировке клеток в гладкомышечные клетки.

В шестом разделе главы показана оценка дифференцировки стволовых клеток мочи в клетки уротелия. В результате диссертантом не было обнаружено достоверного увеличения экспрессии цитокератинов под воздействием высокой концентрации EGF, несмотря на многочисленные попытки и ранжирование концентрации EGF и исходной плотности посадки клеток, что ставит под вопрос возможность применения EGF для дифференцировки стволовых клеток мочи в клетки уротелия.

Седьмая часть главы «Результаты» посвящена оценке пролиферативной активности и жизнеспособности стволовых клеток мочи на биоматериале коллагена первого типа из коровьей кожи. Автор продемонстрировал, что стволовых клеток мочи хорошо прикрепляются и пролиферируют на биоматериале коллагена первого типа.

В заключении подводятся итоги проведенных исследований, и объединяет все полученные в работе результаты, логично приводит к важным как с фундаментальной, так и с практической стороны выводам.

Выводы вполне логично вытекают из результатов диссертационной работы и в достаточной мере соответствуют цели и поставленным задачам проведенного научного исследования.

Диссертация написана без грамматических и стилистических неточностей, изложена хорошим, образным научным языком.

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. Автореферат полностью соответствует содержанию диссертации.

Вопросы и замечания

При изучении диссертации возникли следующие вопросы:

1. Проводили ли вы цитогенетические исследования стволовых клеток мочи при культивировании, что является важным в безопасности для планирования дальнейшего их применения в практику?

2. Как длительно проводилось культивирование, сколько максимум пассажей стволовых клеток мочи было проведено в исследовании?

Поставленные вопросы носят дискуссионный характер и не влияют на оценку диссертации в целом. При анализе диссертации Васютина И.А. принципиальных замечаний не возникло.

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, а также оценки возможности их применения в тканевой инженерии органов нижних мочевых путей. Диссертация не содержит недостоверных 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.

Руководитель Центра
биомедицинских и аддитивных технологий,
заведующая кафедрой регенеративной медицины,
гематологии, молекулярной цитогенетики
с курсом педиатрии МБУ ИНО
ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России
доктор медицинских наук (14.01.21 – гематология и переливание крови,
14.01.08 – педиатрия), доцент

Астрелина Татьяна Алексеевна

Подпись доктора медицинских наук, доцента Астрелиной Т.А. - заверяю:

Ученый секретарь - заведующий организационно
методическим отделом
ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России
кандидат медицинских наук



Голобородько Евгений Владимирович

26.02.2021г.

ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России
Адрес: 123098, Москва, ул. Маршала Новикова, д. 23
Телефон: +7 (499)190-85-55
E-mail: fmbsc-fmba@bk.ru