

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертацию Малашичевой Анны Борисовны на тему «Тканеспецифические особенности сигнального пути Notch в клетках сердечно-сосудистой системы», представленную к защите на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности: 03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология.

Актуальность темы диссертационного исследования Анны Борисовны Малашичевой определяется важным вкладом сигнального пути Notch в клеточную дифференцировку, в частности, в дифференцировку эндотелиальных и гладкомышечных клеток. Это определяет значимость сигнального пути Notch в процессах, связанных с формированием сердца и сосудов.

Диссертационное исследование Анны Борисовны Малашичевой посвящено идентификации тканеспецифических особенностей сигнального пути Notch в клетках сердечно-сосудистой системы при различных сердечно-сосудистых патологиях. В частности, проводится сравнительный анализ глобальной экспрессии генов сигнального пути Notch в клетках сердца и сосудов, в том числе аортальных эндотелиальных и гладкомышечных клетках пациентов с аневризмой восходящего отдела аорты, а также эндотелиальных и интерстициальных клетках аортального клапана сердца. В отношении сердечно-сосудистой патологии оценивается роль активации и инактивации генов сигнального пути Notch при остеогенной дифференцировке интерстициальных клеток аортального клапана сердца (феномен, имеющий принципиальное значение в развитии кальцинирующего аортального стеноза), межклеточных взаимодействиях между эндотелиальными и интерстициальными клетками аортального клапана сердца, при остром и хроническом гипоксических состояниях – инфаркте миокарда и тетраде Фалло. Все перечисленное свидетельствует о несомненной актуальности темы представленного диссертационного исследования как с позиции клеточной биологии и гистологии, так и с позиции молекулярной медицины, поскольку проведенные эксперименты предоставляют целый спектр молекулярных мишеней для разработки новых методов высокоточной терапии.

Диссертационное исследование Анны Борисовны Малашичевой имеет принципиальное значение для клеточной биологии сердечно-сосудистой системы, поскольку системно определяет принципиальную важность сигнального пути Notch для поддержания гомеостаза сердца и сосудов, в особенности артериального русла. При этом показана ключевая роль компонентов сигнального пути Notch как в функционировании отдельных клеточных популяций, так и в регуляции межклеточных взаимодействий. Детальное изучение механизмов работы сигнального пути Notch при помощи современных методов клеточной и молекулярной биологии открывает возможности для разработки эффективных методов терапии сердечно-сосудистых заболеваний. Таким образом, можно заключить, что представленное диссертационное исследование имеет как теоретическую, так и практическую важность.

Научная новизна диссертационного исследования Анны Борисовны Малашичевой в первую очередь заключается в реализации системного подхода к исследованию Notch-зависимых механизмов поддержания клеточного и тканевого гомеостаза элементов системы кровообращения. Несмотря на отдельные работы различных научных коллективов в этой области, до настоящего момента времени отсутствовали исследования, посвященные анализу общности и специфичности функционирования компонентов сигнального пути Notch в клеточной биологии сердца и сосудов. При этом детально исследованы компоненты сигнального пути Notch (рецепторы Notch1-4 и их лиганды Dll1-4 и Jag1-2); в исследовании использованы разнообразные клеточные популяции: эндотелиальные и гладкомышечные клетки аорты человека, эндокардиальные и интерстициальные клетки аортального клапана сердца, мезенхимальные стволовые клетки человека, полученные из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека кардиомиоциты. С этой позиции логичен и широкий спектр рассматриваемых направлений трансдифференцировки – эндотелиально-мезенхимальный переход (постепенная потеря клетками эндотелиального фенотипа в сочетании с приобретением фенотипа мезенхимального), пластичности сосудистых гладкомышечных клеток (постепенная потеря ими сократительного фенотипа с

приобретением синтетического или остеогенного фенотипа), остеогенная дифференцировка интерстициальных клеток аортального клапана сердца, дифференцировка индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека в кардиомиоциты. Роль сигнального пути Notch изучена на моделях разных сердечно-сосудистых патологий – в исследование включены пациенты с аневризмой восходящего отдела аорты, кальцификацией аортального клапана сердца, инфарктом миокарда (острое ишемическое повреждение), тетрадой Фалло (состояние, характеризующееся хронической системной гипоксией). Все перечисленное свидетельствует о системном характере выполнения работы, который имеет методологическую новизну и позволил получить обладающие абсолютной научной новизной результаты.

В диссертационной работе впервые продемонстрировано ослабление миокардин- и TGF- β -зависимой дифференцировки у пациентов с аневризмой восходящего отдела аорты и различной анатомией аортального клапана (двух- или трехстворчатый клапан). Впервые показано повышение активности сигнального пути Wnt в эндотелиальных клетках пациентов с аневризмой восходящего отдела аорты в сочетании с нарушенной регуляцией механочувствительных генов и нарушением поддержания эндотелиального фенотипа в целом при данной патологии. В диссертационном исследовании впервые показана важность экспрессии сигнального пути Notch в эндотелиальных клетках аорты и аортального клапана сердца для поддержания сократительной дифференцировки сосудистых гладкомышечных и клапанных интерстициальных клеток соответственно. Также получены приоритетные данные по различию механизмов кальцификации, связанной с остеогенной дифференцировкой интерстициальных клеток аортального клапана сердца, в зависимости от анатомии аортального клапана (наличие двух или трех створок). При этом различия эти обусловлены изменениями генной экспрессии уже на стадии инициации кальцификации в ответ на активацию сигнального пути Notch. Стоит отметить выявленный в диссертационном исследовании зависимость между степенью выраженности активации Notch-пути и остеогенной дифференцировки интерстициальных клеток аортального клапана сердца; так, высокая степень

активации вызывает подавление данного патологического направления дифференцировки, приводящего к формированию очагов эктопической минерализации.

Большую важность имеют проведенные в диссертационном исследовании эксперименты, направленные на изучение взаимодействий между механическим стрессом, экспрессией компонентов сигнального пути Notch и развитием эндотелиально-мезенхимального перехода. Интерес вызывают полученные данные о зависимости активации Notch-пути от экспериментальной модели: так, при сокультивировании эндотелиальных и интерстициальных клеток аортального клапана повышенной активностью данного сигнального пути характеризовались именно эндотелиальные клетки, в то время как интерстициальные клетки демонстрировали активацию путей остеогенной дифференцировки.

Обоснованность научных положений и выводов, сформулированных в диссертации, доказана достаточным количеством экспериментальных данных, применением современных методов исследования.

Задействованы разнообразные категории пациентов (пациенты с аневризмой восходящего отдела аорты, кальцификацией аортального клапана сердца, инфаркта миокарда, тетрадой Фалло), а также спектр исследованных клеточных популяций (первичные эндотелиальные и гладкомышечные клетки аорты, эндотелиальные и интерстициальные клетки аортального клапана сердца, различные культуры мезенхимальных клеток, дифференцированные из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток кардиомиоциты). Примененные экспериментальные методы также разнообразны и включают в себя анализ пролиферации и миграции клеток, их культивирование в условиях гипоксии и выраженного напряжения сдвига, гено-инженерные методы, оценку генной экспрессии, оценку белковой экспрессии.

О достоверности результатов диссертационного исследования свидетельствуют массивный объем экспериментального материала, широкий спектр выполненных исследований, многократно повторенные эксперименты, использование современных методов исследования и статистической обработки полученных результатов.

Хочется отметить блестяще написанное заключение диссертационной работы, информативный обобщающий рисунок и очень хорошо сформулированные выводы.

Выводы целиком и полностью основаны на результатах собственных исследований и логично вытекают из материалов диссертации. Это позволяет признать полученные результаты значимыми, а выводы и положения, сформулированные в диссертации, достоверными.

Диссертация изложена на 348 страницах и состоит из введения, трёх глав, посвящённых обзору литературы, описанию материалов и методов исследования, а также изложению результатов и их обсуждению, заключения, выводов. Список литературы содержит 648 источников, из них 28 на русском языке и 620 на английском. Диссертация иллюстрирована 84 рисунками и 7 таблицами.

Основные положения работы были многократно представлены на российских и международных конференциях.

По теме диссертации опубликовано 57 статей в ведущих отечественных (30 статей) и международных (27 статей) журналах, из них 7 обзоров (3 в международных журналах, 4 отечественных), а также 75 работ в сборниках трудов конференций и других изданиях.

В процессе анализа диссертационной работы возникли следующие замечания и вопросы:

1. Как мне кажется, обзор литературы, и так очень полный и прекрасно иллюстрированный, стал бы еще лучше, если бы в него была введена отдельная подглава о моделировании болезней сердца с помощью ИПСК. Такие работы упоминаются в обзоре, но не в виде отдельного раздела.
2. Не очень понятно, почему для получения ИПСК были использованы МСК жировой ткани и мезенхимные клетки сердца – мне кажется, это более трудоемкая для выделения клеток ткань, чем просто кожные фибробласты.
3. В разделе «Материалы и методы» упоминаются маркеры МСК жировой ткани в следующем контексте «Клетки характеризовали при помощи оценки экспрессии традиционных для МСК поверхностных маркеров CD19, CD34, CD45, CD73, CD90 и CD105». Наверное, стоило уточнить, что CD45, CD19,

CD34 - это негативные маркеры, а остальные - позитивные. Кроме того, можно было бы вместо маркера В-клеток CD19 взять CD14, как маркер моноцитов, которые могут прикрепляться к пластику.

4. На рисунке 4.35 приведены гистограммы полученные при проточной цитофлуориметрии МСК и ИК от здоровых доноров и пациентов. Утверждается, что существенной разницы по маркерам не наблюдалось, но не приведена количественная оценка (хотя бы в виде процента положительных клеток на самих гистограммах).
5. Было бы очень информативно, если бы диссертант в виде приложения включил таблицу всех использованных антител с разведениями и указанием производителей.

Сделанные замечания носят рекомендательный характер и ни в коей мере не умаляют ценность этой продуманной и тщательно выполненной диссертационной работы.

Диссертационная работа Анны Борисовны Малашичевой «Тканеспецифические особенности сигнального пути Notch в клетках сердечно-сосудистой системы» является законченной самостоятельной научной работой, выполненной на высоком методическом уровне. Диссертационное исследование посвящено решению актуальной проблемы – выяснению тканеспецифических особенностей сигнального пути Notch в клетках сердечно-сосудистой системы при различных сердечно-сосудистых патологиях. Выводы, сформулированные автором, обоснованы и подтверждены достоверным материалом, логически вытекают из содержания работы. По своей актуальности, глубине и объему проведенных исследований, научной и практической значимости полученных результатов, научных положений, выводов и рекомендаций диссертационная работа Анны Борисовны Малашичевой соответствует требованиям п.п. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» (утверждено Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года № 842 с изменениями Постановления Правительства РФ от 21.04.2016 № 335, в редакции Постановления Правительства РФ от 28.08.2017 г. № 1024), предъявляемым к диссертационным работам на соискание ученой степени

доктора биологических наук, а ее автор, Малашичева Анна Борисовна, заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.03.04 – «Клеточная биология, цитология, гистология».

Заведующая лабораторией
клеточной биологии
Федерального государственного
бюджетного учреждения
Федеральный научно-клинический
центр Физико-химической
медицины Федерального медико-
биологического агентства
доктор биологических наук
член-корреспондент РАН

10.03.2021

Мария Андреевна Лагарькова

Подпись д.б.н. чл.-корр. РАН. - заверяю.
Зам. генерального директора
Федерального государственного
бюджетного учреждения
Федеральный научно-клинический
центр Физико-химической
медицины Федерального медико-
биологического агентства, д.б.н., чл-
корр. РАН



Елена Николаевна Ильина

Федеральное государственное бюджетное учреждение Федеральный научно-клинический центр
Физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства, г. Москва
Телефон +7 (499) 246-7721

Сайт организации <http://rcpcm.org/>