



МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ им. Н.К. КОЛЬЦОВА РАН

ул. Вавилова д. 26, Москва, 119334
Тел.: (499) 135-33-22. Факс (499)135-80-12. E-mail: info@idbras.ru
ОКПО: 02699062 ОГРН 1027700450800 ИНН/КПП 7736044850/773601001
<http://idbras.ru>

12.09.2022 № 12506/01-280
На № 12316-806-250 от 16.06.2022

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор
Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
Института биологии развития
им. Н.К. Кольцова РАН,
д.б.н., член-корреспондент РАН
Васильев Андрей Валентинович

«12» сентября 2022

ОТЗЫВ

ведущей организации Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН (ИБР РАН) на диссертацию *Хорольской Юлии Игоревны* «Подходы к восстановлению поврежденной ткани роговицы глаза с использованием лимбальных стволовых и индуцированных плюрипотентных клеток» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.22. – Клеточная биология.

Актуальность исследования. Диссертационная работа Хорольской Ю.И. посвящена разработке научных и практических подходов к разработке технологий восстановления эпителия роговицы при лимбальной недостаточности. Эта патология с достаточно хорошо изученным патогенезом имеет, однако, ограниченный спектр методов лечения. Поскольку часто лимбальные клетки поражаются на обоих глазах, источник для регенерации и материал для трансплантации отсутствует. Специфическая ниша лимбальных стволовых клеток, их уникальная способность поддерживать самообновление эпителия роговицы на протяжении всей жизни предъявляют к потенциальному клеточному источнику регенерации высокие требования. Несмотря на то, что технология трансплантации лимбальных клеток в мире в целом разработана, остаются актуальными вопросы, откуда брать клеточный материал в случае поражения

обоих глаз, какими условиями нужно обеспечить пересаживаемые клетки для долговременного приживления и что может повлиять на заселение лимбальной ниши стволовыми клетками. Таким образом, актуальность работы Юлии Игоревны не вызывает сомнений.

Структура и содержание, научная новизна. Диссертация Хорольской Ю.И. изложена на 143 страницах и написана по традиционному плану. Она состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов, обсуждения, выводов и списка процитированной литературы. Также представлен список публикаций по теме диссертации. Диссертация проиллюстрирована 36 рисунками и 5 таблицами. В весьма подробном обзоре литературы приведены данные относительно клеточного состава роговицы, в том числе особенностей лимбальной зоны, характера и источников регенерации роговицы в физиологическом состоянии и при повреждении, охарактеризован синдром лимбальной недостаточности, приведены сведения о современных возможностях и перспективах использования клеточных технологий для восстановления целостности роговицы, подробно рассмотрены варианты скаффолдов и клеточных компонентов тканеинженерных конструкций для восстановления роговицы, отдельно рассмотрены индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) и мезенхимные стволовые клетки (МСК) как возможные клеточные источники регенерации роговицы, представлено краткое описание используемых в экспериментальной офтальмологии моделей. Резюмирующая часть отсутствует, что можно отнести к недостаткам литературного обзора. В разделе Материалы и методы подробно описан широкий спектр клеточно-биологических, гистологических, молекулярно-биологических и связанных с исследованиями на животных методик, использованных в работе. Многие из них весьма трудоемки, что подтверждает хороший методический уровень рассматриваемой диссертационной работы. В разделе Результаты подробно описан процесс получения и характеристики МСК лимба кролика, меченого зеленым флуоресцентным белком (GFP), протокол и результаты получения ИПСК-GFP и их дифференцировки в лимбальном направлении, показавшей, впрочем, низкую эффективность – данный раздел работы требует в дальнейшем разработки и более глубокого исследования. Несомненными достоинствами работы являются разработанные модели для исследования потенциала трансплантированных клеток *ex vivo* и *in vivo*. Прослежена судьба МСК роговицы, трансплантированных на коллагеновом гидрогеле, в дефект роговицы, смоделированный на культивированной роговице свиньи. Данный подход может быть использован в широком спектре исследований, поскольку модель хорошо воспроизводит нативный глаз и подробно охарактеризована. Несомненную ценность представляют также результаты исследований *in vivo*. Вообще,

комплекс «флуоресцентно меченые клетки кролика-модель лимбальной недостаточности на кролике» будет востребована в исследованиях в области регенеративной медицины роговицы. В разделе Обсуждение представлены соображения автора по поводу полученных результатов, перспектив работы и причин некоторых неудач.

Новизна исследования заключается в том, что разработаны подходы к оценке эффективности для восстановления эпителия роговицы лимбальных стволовых клеток мезенхимного происхождения, получена и охарактеризована линия лимбальных МСК, стабильно экспрессирующих GFP. Разработаны условия культивирования органной культуры свиной роговицы, позволяющие поддерживать структурную целостность роговицы и жизнеспособность клеток в ее составе в процессе культивирования, моделировать травму роговицы, а также производить в область травмы трансплантацию тканеинженерных конструкций. Впервые на модели лимбальной недостаточности у кроликов проанализирована судьба меченых GFP клеток, трансплантированных в составе тканеинженерной конструкции на основе амниотической мембраны человека.

Работа Хорольской Ю.И. представляет большой интерес для исследователей во многих областях биомедицины. Полученные клеточные линии могут быть использованы в исследованиях патологий роговицы, межклеточных взаимодействий, при разработке новых биомедицинских клеточных продуктов. Разработанные модели могут быть использованы в доклинических исследованиях клеточных продуктов и тканеинженерных конструкций для лечения лимбальной недостаточности и стимуляции регенерации роговицы.

В диссертационной работе Хорольской Ю.И. использованы современные методы экспериментальной биологии, проанализировано достаточное количество образцов, проведен грамотный статистический анализ. Обоснованность и достоверность выводов обеспечивают независимые повторы экспериментов и наличие адекватных контролей, а также проведенный анализ полученных экспериментальных данных. Все выводы следуют из результатов работы и содержат ответ на поставленные в диссертации задачи.

Основные положения и результаты диссертационной работы представлены в 6 статьях, из них три в высокорейтинговых международных журналах. Основные результаты работы получены автором самостоятельно. Задачи исследования автором успешно решены.

Замечания. По диссертационной работе Хорольской Ю.И. имеются следующие замечания:

- 1) В описании результатов в ряде разделов кратко повторяется описание методик, что затрудняет оценку полученных результатов.

- 2) Стоило бы сравнить параметры дифференцировки ИПСК, трансдуцированных GFP и без него, в лимбальном направлении.
- 3) Осталось неясным, что все-таки возможно предпринять для увеличения эффективности дифференцировки ИПСК человека в лимбальном направлении. Этот раздел работы выглядит весьма фрагментарно, что, впрочем, объясняется чрезвычайной сложностью затронутой проблемы.
- 4) Несомненным достоинством диссертации является разработка модели клеточной трансплантации на кролике с возможностью отслеживать судьбу трансплантированных клеток. Тем обиднее отсутствие в исследовании контрольной группы животных «без лечения».
- 5) Вывод №3 об эпителиальной трансдифференцировке МСК нуждается в уточнении критериев оценки подобной трансдифференцировки, поскольку, судя по приведенным результатам, речь может идти о «молекулярной мимикрии».

Высказанные замечания не снижают общей оценки работы.

Заключение

Диссертация Хорольской Ю.И. «Подходы к восстановлению поврежденной ткани роговицы глаза с использованием лимбальных стволовых и индуцированных плюрипотентных клеток» полностью соответствует п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 № 842 (в редакции от 11.09.2021), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.22. – Клеточная биология. Отзыв обсужден и утвержден на открытом семинаре лаборатории клеточной биологии ИБР РАН, протокол №5 от «30» августа 2022 года.

Заведующий

лабораторией клеточной биологии ИБР РАН,

доктор биологических наук, член-корреспондент РАН

Воротеляк Е.А.

«Подпись д.б.н., чл.-корр. РАН Воротеляк Екатерины Андреевны удостоверяю».

Ученый секретарь

ИБР РАН,

кандидат биологических наук

119334, Москва, ул. Вавилова, 26.

email: m.khabarova@idbras.ru , тел. +7 (499) 135-54-27



Хабарова М.Ю.