

## ОТЗЫВ

на автореферат диссертации Брюховецкого Игоря Степановича на тему «Взаимодействие стволовых и опухолевых клеток на модели глиобластомы» представленной на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология.

### **Актуальность темы исследования**

С момента введения понятия «стволовая клетка» Петербургским гистологом Александром Александровичем Максимовым прошло более 100 лет. Сегодня применение стволовых и прогениторных клеток для лечения заболеваний и травм стало новой клинической реальностью, которая пришла на смену традиционалистским терапевтическим подходам. Однако этот путь вовсе не был легким, а направление движения всегда очевидным. Помимо морально-этических и юридических вопросов, решение которых возможно только по достижении определенного уровня зрелости общества, на пути новой отрасли науки вставали медицинские вопросы, многие из которых имеют исключительно фундаментальный характер.

К концу 20-го века трансплантация стволовых клеток вышла за рамки метода, и, преодолевая многочисленные ограничения, поразительно быстро трансформировалась в качественно новую отрасль медицинской науки - регенеративную медицину. При этом, лавинообразный рост интереса к терапевтическим возможностям стволовых клеток привел к значительному пересмотру ряда фундаментальных взглядов и представлений, значительно обогатившем клеточную биологию. Так, выделение из мозга нейральных стволовых клеток позволило опровергнуть канонизированные представления о невозможности образования новых нейронов в мозге взрослого человека. В процессе создания новых способов введения стволовых клеток в организм пациента с травмой нервной системы была предложена идея биополимерных имплантируемых материалов, которая во многом определила современное понимание исключительно важной роли внеклеточного матрикса в биологии

эукариотических клеток. Эксперименты со способами введения клеточного трансплантата позволили обнаружить качественно новые свойства стволовых клеток человека, что пролило новый свет на проблему регенерации вообще, и восстановления органов и тканей человека в частности. Изучение стволовых клеток позволило объяснить уникальные возможности в регенерации частей тела ряда земноводных и амфибий, а открытие нейрогенеза в зрелом мозге – сформировать современную концепцию нейропластичности, как ключевого свойства человеческого мозга, заключающееся в возможности изменяться под действием опыта, а также восстанавливать утраченные связи после повреждения. Можно с уверенностью говорить, что именно клеточная трансплантология и тканевая инженерия способствовала формированию современной биомедицины.

Стволовые клетки активно применяются при ишемическом инсульте, болезни Альцгеймера и Паркинсона, боковом амиотрофическом склерозе, рассеянном склерозе, сахарном диабете, тяжелых формах токсического и травматического повреждения мозга. Однако уже с момента самых первых успешных трансплантаций стволовых клеток максимум ожиданий от их применения было связано именно с лечением онкологических заболеваний.

Начало 21-го века ознаменовалось достижением исключительно высоких результатов в лечении некоторых фатальных онкогематологических заболеваний. Убежден, что это только начало. В пользу этого свидетельствуют современные тренды развития биомедицины – создание крупных общенациональных и региональных банков стволовых клеток, активное внедрение малоинвазивных способов получения биоматериала, активная интеграция трансплантационных технологий в протоколы лечения онкологических больных. При этом весьма символично, что именно опасность онкологической трансформации клеточного трансплантата стала главным из сдерживающих факторов, направившего многих энтузиастов по пути научного поиска и эксперимента, потребовав ответа на вопрос о глубинных причинах и механизмах канцерогенеза.

Представляется исключительно важным, что следствием развития этого направления стала идентификация и выделение особой категории неопластических элементов – раковых или опухолевых стволовых клеток. Примечательно, что практически все современные концепции объясняющие появления этого типа клеток, начиная от пионерских работ биологов - эволюционистов до современных молекулярно-генетических теорий указывают на прямую связь между нормальной и опухолевой стволовыми клетками. В ряде концептуальных работ даже высказывается мысль, что именно благодаря происхождению от нормальных стволовых клеток организма человека раковая стволовая клетка не распознается и не уничтожается иммунной системой человека (Заридзе и т.д., 2010).

Однако, если даже гипотетически рассматривать раковую стволовую клетку – как накопившие некое предельное число мутаций нормальную стволовую клетку, для которой подобный качественно-количественный переход становится возможным, то логично задать вопрос. Каковы механизмы внешнего контроля над поведением такой клетки? А такие механизмы обязательно должны существовать, иначе бы продолжение жизни стало невозможным. Очевидно, этот контроль реализуется в процессе локального взаимодействия патологически измененной клетки с микроокружением. Именно благодаря согласованным межклеточным взаимодействиям возможно существование организма как единого целого, и именно локальные межклеточные взаимодействия между опухолевыми и нормальными стволовыми клетками несут на себе ту самую регламентную функцию, благодаря которой возможна амортизация неопластического процесса.

В свете сказанного, диссертантом декларируется цель изучить межклеточные и межсистемные взаимодействия между нормальными стволовыми и опухолевыми клетками, и обосновать возможность создания на их основе качественно нового типа биомедицинских препаратов и технологий. Данная цель звучит очень свежо и актуально применительно к

такой опухоли как глиобластома. Указания на диалектическое единство противоопухолевых свойств нормальных стволовых-прогениторных клеток зрелого мозга человека и высокую агрессивность опухолевых стволовых клеток глиобластомы прослеживаются в работах Doetch (1999), Kemperman (2000), Aboody (2001), Moore (2004) и некоторых других авторов. Однако большинство исследователей констатируя наличие у нормальных стволовых клеток противоопухолевых свойств дистанцируется от систематизированного изучения проблемы, что вероятно связано с ограничениями существующих традиционных методологических подходов. В этой связи несомненно сильной и оригинальной стороной работы является подход к решению проблемы в неразрывной связи цитологического и гистологического материала с современными технологиями многомерной биологии.

Таким образом, диссертационное исследование И.С. Брюховецкого выполнено на высоком научном уровне и посвящено решению важной фундаментальной медицинской проблемы, имеющей непосредственное прикладное значение.

### **Научная новизна**

Впервые изучены закономерности миграции стволовых клеток к клеткам различных линий *in vitro*. Установлено, что миграция нейтральных стволовых (и прогениторных) клеток к CD133+ клеткам глиобластомы более выражена по сравнению с их подвижностью в отношении клеток иного происхождения. Показано, что животных с экспериментальной глиобластомой трансплантированные стволовые клетки (как НСК, так и ГСК) мигрируют в опухоль и накапливаются в очагах инвазии и некроза неопластической ткани. В условиях *in vitro* выявлена способность ГСК человека адгезировать к клеткам глиальных опухолей, замедляя темпы их пролиферации. Процесс межклеточного взаимодействия сопровождается переносом цитоплазматического материала ГСК в опухолевые клетки, что более выражено для клеток линии С6 в сравнении с CD133+ клетками линии U87. Установлено, что накопление гемопоэтических CD34+ стволовых

клеток в опухолевом очаге *in vivo* сопровождается усилением синтеза эндотелина 1, подавлением продукции TGF-1 $\beta$  и увеличением числа *iba-1*+ глиальных клеток.

С использованием протеомного анализа показано, что воздействие TGF-1 $\beta$  сопровождается трансформацией молекулярного фенотипа клеток линии U87 глиобластомы человека, вызывая экспрессию белков пролиферации, резистентности, инвазии и репарации ДНК и угнетая синтез белков апоптоза, взаимодействия с межклеточным матриксом и аэробного метаболизма.

Установлено, фаскаплизин дозозависимо вызывает апоптоз клеток глиомы С6. В концентрации 2 мкМ эффективность цитотоксического действия фаскаплизина превосходит противоопухолевый препарат темозоломид. При уменьшении концентрации фаскаплизина до 0,5 мкМ эффективность цитотоксического действия снижается, а формируемый цитостатический эффект возрастает с увеличением времени экспозиции. Модификация ГСК фаскаплизином трансформирует цитостатическое действие клеточного препарата в цитотоксическое, сопровождаясь достоверным уменьшением объема опухоли и увеличением продолжительности жизни экспериментальных животных.

Методом биоинформационного анализа показано, что 63,2% белков протеома НСК и ОСК являются сходными, что значительно превосходит другие типы СК. Установлено, что при неопластической трансформации минимально изменены сигнальные пути интегринов и фокальной адгезии, что определяет возможность таргетного воздействия на них.

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

Научные положения и выводы диссертации обоснованы достаточным объемом материала, грамотным планированием эксперимента, использованием различных методов исследования, использованием современных методов исследования, корректным анализом полученных

данных. Результаты эксперимента обработаны с использованием современных методов статистики, что позволяет считать результаты достоверными и обоснованными. По теме диссертации опубликовано 20 статей в отечественных и зарубежных научных журналах входящих в список ВАК РФ и реферируемых базами Скопус, «Сеть науки» и РИНЦ, 8 глав в монографиях. Получено, 2 патента на изобретение. Материалы диссертации доложены на Российских и международных научных конференциях, симпозиумах и конгрессах.

### **Объем и структура реферата**

Реферат представлен на 40 страницах машинописного текста, написан хорошим русским языком, хорошо проиллюстрирован, содержит основные сведения обо всех разделах диссертационной работы, данные о внедрении результатов и публикациям по диссертационные исследования.

### **Вопросы и замечания по работе**

Имеются мелкие стилистические ошибки в тексте автореферата, но принципиальных замечаний по работе нет.

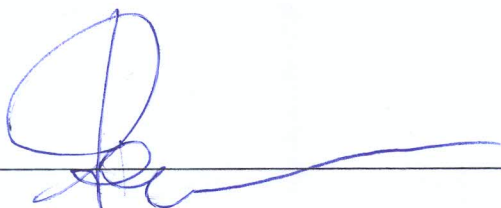
### **Заключение**

Диссертационное исследование Игоря Степановича Брюховецкого «Взаимодействие стволовых и опухолевых клеток на модели глиобластомы» является завершенной научно - квалификационной работой, в которой содержатся новые данные о закономерностях и механизмах взаимодействия и взаимовлияния тканеспецифических постнатальных стволовых клеток с опухолевыми клетками, получены новые данные о специфике молекулярно-биологических различий между стволовыми клетками различных типов, обоснован противоопухолевый потенциал тканеспецифических стволовых клеток и предложены способы его усиления, идентифицированы

перспективные мишени для регуляции инвазивного и пролиферативного потенциала глиобластомы.

Работа соответствует всем требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» предъявляемых к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, утвержденной постановлением правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года №842, а ее автор, несомненно, заслуживает присуждения ученой степени доктора медицинских наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология.

Репин Вадим Сергеевич



Д.м.н., профессор, член – корр. РАН  
главный научный сотрудник  
Лаборатории клеточной биологии и  
патологии развития Федерального  
государственного бюджетного  
научного учреждения «Научно-  
исследовательский институт общей  
патологии и патофизиологии»

125315, Москва, Балтийская, 8  
+7(499) 151 17 56

[1vadim.repin@gmail.com](mailto:1vadim.repin@gmail.com)

Подпись профессора Репина В.С. удостоверяю \_\_\_\_\_  
секретарь НИИОПП к.м.н. Скуратовская Л. Н.

