

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор
ФГБУ ГНЦ ФМБЦ
им. А.И. Бурназяна ФМБА России
доктор мед. наук, профессор,
член-корр. РАН



А.С. Самойлов

2022 г.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

**Федерального государственного бюджетного учреждения
«Государственный научный центр Российской Федерации –
Федеральный медицинский биофизический центр
имени А.И. Бурназяна»
(ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России)**

Диссертация Брунчукова Виталия Андреевича «Экспериментальное применение клеточных технологий при радиационных ожогах» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.1 – Радиобиология выполнена на базе Центра биомедицинских и аддитивных технологий ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России.

В период с 2016 г. по 2017 г. соискатель Брунчуков В.А. работал в должности инженера лаборатории редактирования генома Центра биомедицинских и аддитивных технологий ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России, с 2017 по 2022 г. являлся младшим научным сотрудником данной лаборатории, с 2022 г. работает в должности научного сотрудника.

В 2015 г. Брунчуков В.А. окончил Московскую государственную академию ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И. Скрябина по специальности «Биология», в июле 2017 года с отличием окончил магистратуру в Московской

государственной академии ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И. Скрябина по специальности «Биология». В 2017 г. прошел курс повышения квалификации по клинической лабораторной диагностике, в 2019 г. прошел курс повышения квалификации «Реализация принципов надлежащей лабораторной практики при проведении доклинических исследований в современном виварии», в 2021 г. прошел курс повышения квалификации «Радиационная безопасность и радиационный контроль».

Удостоверение о сдаче экзаменов в объеме кандидатского минимума выдано в 2019 г. Федеральным государственным бюджетным образовательным учреждением высшего образования Московской государственной академией ветеринарной медицины и биотехнологии МВА имени К.И. Скрябина по направлению «Радиобиология».

Тема диссертации утверждена на заседании секции ученого совета по биомедицинским и клиническим технологиям ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им А.И. Бурназяна ФМБА России (протокол № 63/2 от 7 сентября 2018 г.)

Научный руководитель: доктор медицинских наук, доцент, 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 Астрелина Татьяна Алексеевна.

По итогам обсуждения принято следующее заключение:

Актуальность темы исследования обусловлена серьезной проблемой заживления язвенной поверхности кожи с сохранением ей анатомической целостности и функциональной активности при местном лучевом поражении (МЛП) в науке и клинике. Несмотря на достижения в понимании механизма патогенеза МЛП, не всегда удается достигнуть полноценного излечения при использовании стандартных методов лечения. МЛП характеризуются частым рецидивирующими ходом течения заболевания, что снижает качество жизни пациента, требуют постоянного ухода за очагом поражения и негативно сказываются на работоспособности пациента.

Повреждения базальных стволовых клеток эпидермиса и сосудов микроциркуляторного русла обуславливают степень повреждения кожи при МЛП. Исход течения заболевания будет зависеть от соотношения повреждений и репаративных процессов в данных структурах. Регенеративная медицина является перспективным направлением современной медицины, способным улучшить качество жизни пациента, увеличить продолжительность его жизни, восстановить поврежденные функции и структуры его органов и тканей.

В качестве терапевтического источника для МЛП обращают на себя все больший взор исследователей мезенхимальные стромальные клетки (МСК). МСК способны самообновляться и могут дифференцироваться в различные виды тканей. Доказана эффективность МСК в заживлении раневой поверхности кожи и ее придатков, сердца, скелетных мышц и хряща и пр. Применение МСК приводит к усилению процессов ангиогенеза, эпителизации, уменьшению процессов фиброзирования, улучшению грануляций, сокращению сроков заживления ран, восстановлению волосяного покрова. При этом основной терапевтический эффект МСК связан с действием их паракринного профиля, регулирующего межклеточные взаимодействия.

Однако на сегодняшний день данные по применению МСК из различных источников и их паракринных факторов для терапии МЛП противоречивы, что делает настоящее исследование актуальным.

Научная новизна исследований

Основными положениями научной новизны диссертации Брунчукова В.А. являются:

1. Впервые показано, что применение мезенхимальных стромальных клеток слизистой ткани десны человека, концентрата кондиционированной среды мезенхимальных стромальных клеток слизистой ткани десны человека, концентрата кондиционированной среды мезенхимальных стромальных клеток плаценты человека при местных лучевых поражениях у лабораторных животных с 14 суток до 112 суток после облучения эффективно, приводит к сокращению

язвенной поверхности на 87%, 85,7% и 95,4% соответственно по сравнению с контролем – 67,4%, $p \leq 0,05$.

2. Доказано иммуногистохимическими исследованиями, что применение мезенхимальных стромальных клеток слизистой ткани десны человека при местных лучевых поражениях у лабораторных животных с 14 суток до 112 суток после облучения приводит к улучшению васкуляризации - увеличению экспрессии VEGF, а также увеличению числа нервных волокон – увеличение экспрессии PGP 9.5.

3. Впервые показано, что применение мезенхимальных стромальных клеток слизистой ткани десны крысы и концентрата кондиционированной среды мезенхимальных стромальных клеток слизистой ткани десны крысы не эффективно, приводит к незначительному сокращению местных лучевых поражений у лабораторных животных с 14 суток до 112 суток после облучения на 60,2% и 50,4% в сравнении с контрольными группами.

4. Доказано иммуногистохимическими исследованиями, что применение мезенхимальных стромальных клеток слизистой ткани десны крысы, концентрата кондиционированной среды мезенхимальных стромальных клеток слизистой ткани десны крысы, мезенхимальных стромальных клеток плаценты человека и отсутствие терапии в группе контроль при местных лучевых поражениях с 21 суток до 112 дня после облучения приводит к увеличению воспалительного процесса - увеличение маркера клеток макрофагального ряда CD68 в тканях.

5. Впервые показана наибольшая эффективность - полное заживление местных лучевых поражений у лабораторных животных на 112 сутки после облучения при применении мезенхимальных стромальных клеток слизистой ткани десны человека и концентрата кондиционированной среды мезенхимальных стромальных клеток плаценты человека в 60% и 40 % случаев соответственно. Применение концентрата кондиционированной среды мезенхимальных стромальных клеток слизистой ткани десны человека, мезенхимальных стромальных клеток плаценты человека, концентрата кондиционированной среды мезенхимальных стромальных клеток слизистой ткани крысы при местных лучевых поражениях у лабораторных

животных с 14 суток до 112 суток после облучения приводит к полному сокращению язвенной поверхности в 20% случаев; применение мезенхимальных стромальных клеток слизистой ткани десны крысы и отсутствие терапии в группе контроль не приводит к полному заживлению язвенной поверхности (0%).

6. Впервые показано, что применение МСК из различных источников (слизистая ткань десны человека, слизистая ткань десны крысы, плацента человека) при местных лучевых поражениях с 21 по 112 сутки после облучения приводит к усилению процессов неоангиогенеза (увеличение экспрессии CD31). Также применение МСК слизистой ткани десны человека и МСК слизистой ткани десны крысы приводит к усилению процессов ангиогенеза (увеличение VEGF в эндотелии и строме).

Научно-практическая значимость работы

Результаты проведенных исследований указывают на сокращение язвенной поверхности (от 85 до 95%) местных лучевых поражений у лабораторных животных с 14 суток до 112 суток после облучения при применении мезенхимальных стромальных клеток слизистой ткани десны человека, концентрата кондиционированной среды мезенхимальных стромальных клеток слизистой ткани десны человека, концентрата кондиционированной среды мезенхимальных стромальных клеток плаценты человека.

Данные полученных результатов исследований применения мезенхимальных стромальных клеток слизистой ткани десны и концентрата кондиционированной среды мезенхимальных стромальных клеток слизистой ткани десны в зависимости от донора биоматериала (человек и крыса) противоположно различаются, которые можно использовать для дальнейшего изучения влияния и оценки методов лечения на процессы регенерации и заживления местных лучевых поражений.

Результаты исследований позволяют рекомендовать применение мезенхимальных стромальных клеток слизистой ткани десны человека и концентрата кондиционированной среды мезенхимальных стромальных клеток плаценты в последующем в клинической практике для эффективного лечения местных лучевых поражений.

Личное участие автора в получении научных результатов, изложенных в диссертации

Автор провел анализ опубликованных литературных данных, посвященных применению МСК из различных источников и их паракринных факторов в составе кондиционированных сред в терапии МЛП, а также оказываемых ими эффектам; осуществил выделение культуры МСК из образца слизистой ткани десны крысы, ее дальнейшее культивирование и характеристику согласно минимальным критериям, предъявляемым Международным обществом клеточной терапии; провел концентрирование в лабораторной системе фильтрации в тангенциальном потоке культуральной и кондиционированных сред, полученных от МСК из различных источников, провел облучение животных на рентгеновской установке; провел терапевтические мероприятия для животных с МЛП; статистически обработал и проанализировал полученные результаты. Материалы диссертационной работы были представлены автором на многочисленных профильных международных и российских конференциях.

Степень обоснованности научных положений, выводов, рекомендаций

Диссертационная работа выполнена на высоком научном уровне с использованием современных и обоснованных методов исследований, расчетов и анализа. Полнота и объем материала в достаточной мере обусловливают выводы, вытекающие из полученных соискателем результатов и отвечающие на поставленные в диссертации задачи. Научные положения и выводы четко обоснованы и логично вытекают из данных, полученных автором.

Степень достоверности результатов работы

Достоверность и обоснованность полученных результатов обеспечивается четкой постановкой задач, достаточным объемом исследования, применением современных лабораторных методов исследования, корректной статистической обработкой данных и всесторонней оценкой полученных результатов в сравнении с данными научной литературы.

Полнота опубликования в печати

По материалам диссертации опубликовано 8 печатных работ в журналах,

входящих в список ВАК Минобрнауки России.

Статьи, опубликованные в рецензируемых научных журналах, определенных ВАК:

1. Nikitina VA, Astrelina TA, Ostashkin AS, Nugis VYu, Karaseva TV, Machova AE, Dobrovolskaya EI, Usupzhanova DYu, Rodin S, Brunchukov VA, Lauk-Dubitsky SE, Brumberg VA, Kobzeva IV, Suchkova YuB, Lomonosova EE, Bushmanov AY, Samoilov AS. Clonal chromosomal and genomic instability during human multipotent mesenchymal stromal cells long-term culture Clonal chromosome aberrations & aneuploidy in hMSC. PLoS One. 2018 Feb 12;13(2):e0192445. doi: 10.1371/journal.pone.0192445. eCollection 2018.
2. Самойлов А.С., Астрелина Т.А., Аксененко А.В., Кобзева И.В., Сучкова Ю.Б., Никитина В.А., Усупжанова Д.Ю., Брунчуков В.А., Растиоргуева А.А., Карасева Т.В., Удалов Ю.Д. Перспективы применения регенеративной медицины в клинической практике. Главврач. 2019. № 10. С. 38-47. DOI: 10.33920/med-03-1910-06
3. Брунчуков В.А., Т.А. Астрелина, В.А. Никитина, И.В. Кобзева, Ю.Б. Сучкова, Д.Ю. Усупжанова, А.А. Растиоргуева, Карасева Т.В., А.В. Гордеев, О.А. Максимова, Л.А. Наумова, С.В. Лищук, Е.А. Дубова, К.А. Павлов, В.А. Брумберг, А.Е. Махова, Е.Е. Ломоносова, Е.И. Добровольская, А.Ю. Бушманов, А.С. Самойлов. Экспериментальное лечение местных лучевых поражений мезенхимальными стволовыми клетками и их кондиционной средой. Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2020. Том 65. № 1, с.5-12. DOI: 10.12737/1024-6177-2020-65-1-5-12
4. T. Astrelina, V. Brunchukov, A. Rastorgueva, D. Usupjanova, V. Nikitina, I. Kobzeva, A.Samoilov. Effectiveness of local MSC derived from placenta and their conditioned medium in local radiation burn. Cytotherapy. – May 2020. Vol. 22, Issue 5, Supplement, P. S66 (98) <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2020.03.101>
5. Vitaliy Brunchukov, Tatiana Astrelina, Daria Usupzhanova, Anna Rastorgueva, Irina Kobzeva, Victoria Nikitina, Sergei Lishchuk, Elena Dubova, Konstantin Pavlov, Valentin Brumberg, Marc Benderitter, Alexander Samoylov. Evaluation of

the effectiveness of mesenchymal stem cells of the placenta and their conditioned medium in local radiation injuries. Cells 2020, 9(12), 2558; DOI: 10.3390/cells9122558

6. T.Astrelina, V.Brunchukov, A.Rastorgueva, D.Usupzhanova, V.Nikitina, I.Kobzeva, L.Sergey, A.Samoilov. Comparison of the therapeutic potential of human and rats mesenchymal stem cells and their conditioned medium with local radiation injuries. Cytotherapy. Volume 23, Issue 5, Supplement, May 2021, P.S44, <https://doi.org/10.1016/S1465324921003157>.
7. В.А. Никитина, Т.А. Астрелина, И.В. Кобзева, В.Ю. Нугис, Е.Е. Ломоносова, В.В. Семина, В.А. Брунчуков, Д.Ю. Усупжанова, В.А. Брумберг, А.А. Растворгуева, Т.В. Карасева, А.С. Самойлов. Цитогенетическая характеристика диплоидных линий мезенхимных мультипотентных стromальных клеток. Цитология, 2021, том 63, № 3, с. 207–220. DOI: 10.31857/S0041377121030081.
8. В.А. Брунчуков, Т.А. Астрелина, А.С. Самойлов. Анализ эффективности применения клеточной терапии при местных лучевых поражений. Медицинская радиология и радиационная безопасность.2021. Том 66. №1, с.69-79. DOI: 10.12737/1024-6177-2021-66-1-69-78.
9. Растворгуева А.А., Астрелина Т.А., Брунчуков В.А., Усупжанова Д.Ю., Кобзева И.В., Никитина В.А., Лищук С.В., Дубова Е.А., Павлов К.А., Брумберг В.А., Самойлов А.С. Сравнение терапевтического потенциала мезенхимальных стромальных клеток крыс и человека и их кондиционированных сред при местных лучевых поражениях // Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2021. Т. 66. № 4. С.5–12. DOI: 10.12737/1024-6177-2021-66-4-5-12.
- 10.Астрелина Т.А., Аксененко А.В., Кобзева И.В., Брунчуков В.А., Усупжанова Д.Ю., А.С. Самойлов. Применение регенеративных клеточных технологий при лечении тяжёлых местных лучевых поражений у пострадавших в чрезвычайных ситуациях: из опыта работы специалистов Федерального медицинского биофизического центра им. А.И.Бурназяна ФМБА России.

Медицина катастроф, №3•2021, С. 58-64, <https://doi.org/10.33266/2070-1004-2021-3>.

11.V.A. Nikitina, T.A. Astrelina, I.V. Kobzeva, V.Yu. Nugis, E.E. Lomonosova, V.V.Semina, V.A. Brunchukov, D.Yu. Usupzhanova, V.A. Brumberg, A.A. Rastorgueva, T.V. Karaseva, and A.S. Samoilov. Cytogenetic Characteristics of Diploid Lines of Mesenchymal Multipotent Stromal Cells. Cell and Tissue Biology, 2021, Vol. 15, No. 6, pp. 604–615. DOI: 10.1134/S1990519X21060146.

12.Варьясова А.А., Астрелина Т.А., Кобзева И.В., Никитина В.А., Карасёва Т.В., Брумберг В.А., Усупжанова Д.Ю., Брунчуков В.А., Растиоргуева А.А., Леваков С.А., Самойлов А.С. Выделение и биологические характеристики стволовых клеток плаценты. Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. 2021; 20(5): 20–28. DOI: 10.20953/1726-1678-2021-5-20-28.

Патент

1. Самойлов А.С., Астрелина Т.А., Кобзева И.В., Сучкова Ю.Б., Аксененко А.В., Брунчуков В.А., Усупжанова Д.Ю., Удалов Ю.Д. Способ повышения эффективности комплексной терапии при местных лучевых поражениях. Патент. - № 2744519, зарегистрирован 11.03.2021.

Основные положения и результаты диссертационной работы представлялись и докладывались на следующих научно-практических конференциях:

1. Школе-конференции молодых ученых «Ильинские чтения-2018», «Ильинские чтения-2019», «Ильинские чтения-2021»;
2. SIBS-2019;
3. Международной научной конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2019»;
4. II Межрегиональная молодежная научная конференция «Достижения и перспективы молодых ученых», 2019;
5. Радиобиологические основы лучевой терапии, 2019;
6. IV Национальном конгрессе по регенеративной медицине, 2019;
7. Научный авангард, 2021, Научный авангард, 2022;

Заключение

Диссертация Брунчукова Виталия Андреевича на тему «Экспериментальное обоснование применения клеточных технологий при радиационных ожогах» рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.1 – Радиобиология.

Заключение принято на заседании секции №2 Ученого совета ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России.

Присутствовало на заседании 23 человека. Результаты голосования: «за» – 23, «против» – нет, «воздержались» – нет. Решение принято единогласно (протокол №6 заседания секции №2 Ученого совета ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России от 22 июня 2022 г.)

Председатель секции №2
Ученого совета,
доктор мед. наук, профессор

А.Ю. Бушманов

Секретарь секции №2
доктор мед. наук, доцент
отдела №2
клинической и радиационной медицины

Н.А. Метляева

Заведующий Научно-организационного
отдела – Ученый секретарь, доктор мед.
наук

Е.В. Голобородько

