

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА
на диссертационную работу Паюшиной Ольги Викторовны
«Мезенхимные стромальные клетки из эмбриональных и дефинитивных
источников: фенотипические и функциональные особенности»,
представленную на соискание ученой степени доктора биологических
наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология,
гистология.

Исследование множественности потенциалов мезенхимных стромальных клеток (МСК), способных к дифференцировке в различные клеточные типы - одна из фундаментальных задач современной клеточной биологии и биологии развития. Диссертация Паюшиной О.В. представляет собой комплексное сравнительное исследование органотипических особенностей популяций МСК, организующих кроветворное микроокружение, в различных органах транзитного и дефинитивного гемопоэза.

В работе рассмотрены фундаментальные аспекты, которые углубляют понимание динамики изменения содержания популяции МСК в ходе онтогенеза, расширяют представления о закономерностях их функционирования. Паюшиной О.В. впервые показано ингибирование остеогенеза при культивировании МСК на фибронектине и идентифицирован участок молекулы фибронектина, ответственный за этот эффект. Результаты научных исследований Паюшиной О.В. могут быть использованы для создания новых методов лечения, выбора оптимального источника МСК в клеточной терапии.

1. Актуальность темы диссертации.

Актуальность исследования Паюшиной О.В. обусловлена, прежде всего, тем, что в работе проведено сравнительное исследование популяций МСК костного мозга, печени и селезёнки крысы на разных стадиях онтогенеза.

Исследование морфологических, фенотипических и функциональных отличий МСК из разных источников имеет важное значение для разработки экспериментального базиса в области регенеративной медицины, основанной на трансплантации стволовых и прогениторных клеток. В настоящее время в исследовании МСК разработаны протоколы культивирования, достаточно полно изучены профиль экспрессии ключевых генов, выявлены основные направления дифференцировки, но мало известно о структуре дифферона стромальных клеток, а также как МСК приобретают фенотипические и функциональные различия под влиянием микроокружения. В отличие от детально охарактеризованных МСК, выделенных из костного мозга, МСК из других кроветворных органов изучены недостаточно.

Актуальность исследования Паюшиной О.В. обусловлена, прежде всего, тем, что в работе проведено сравнительное исследование популяций МСК костного мозга, печени селезенки крысы на разных стадиях онтогенеза. Этот вопрос очень важен, т.к. применение МСК в регенеративной медицине требует детального понимания механизмов дифференцировки и пролиферации. Изучение фенотипических отличий МСК, полученных из разных кроветворных органов – актуальная задача фундаментальных исследований клеточной и молекулярной биологии.

В работе Паюшиной О.В. была исследована иерархическая структура гетерогенной популяции МСК. Добавление 5-фторурацила (5-ФУ – циклоспецифический агент, оказывающий цитотоксическое действие на протяжении всех стадий клеточного цикла), в среду культивирования избирательно элиминировало клетки высокой степени зрелости и практически не влияло на примитивные клетки с высокой способностью к самоподдержанию. Полученные данные о свойствах субпопуляций МСК, устойчивых к цитотоксическому действию 5-ФУ, открывают новые возможности для их применения в регенеративной медицине.

Также несомненную актуальность имеют исследования, посвящённые анализу поведения МСК в условиях *in vivo*. Экспериментальные данные о

регуляции дифференцировки МСК тканевым микроокружением важны не только для понимания биологии МСК, но и для применения в клинической медицине. В целом, следует отметить, что диссертационная работа Паюшиной О.В. является важным и актуальным исследованием, которое позволило получить новые данные и сформировать концепцию созревания популяции МСК, которое приводит к изменению качества кроветворной ниши.

2. Достоверность и новизна выводов и результатов диссертации.

Работа Паюшиной О.В. хорошо спланирована, автором сделано 7 выводов. Выводы основаны на обширном экспериментальном материале, полностью отражают результаты работы и соответствуют поставленным в исследовании задачам. Работа выполнена на высоком профессиональном уровне с использованием современных молекулярно-генетических методов. Результаты экспериментов обработаны с использованием статистических методов – метода выявления различий между выборками (непараметрический критерий Манна-Уитни) и экспресс-метода Стрелкова. Применение статистических методов обосновано, достоверность каждого результата и вывода не вызывает сомнений.

В диссертационной работе проведен сравнительный анализ МСК, выделенных из костного мозга, печени и селезенки в различные периоды развития, в том числе эмбрионального. Исследована динамика изменения количества МСК в каждом из этих органов. Впервые показана корреляция содержания МСК с активностью кроветворения, присутствие на них антигенов CD73 и, в меньшей степени, CD90. Клеточные культуры сравнивали по клоногенности, способности к адгезии, иммунофенотипу. Первичная культура клеток печени зародышей отличается от первичной культуры, полученной из костного мозга более гетерогенным клеточным составом. В случае МСК, выделенных из печени и селезенки, с уровнем гемопоэза коррелирует относительное содержание КОЕ-Ф и численность

жировых клеток, полученных при адипогенной дифференцировке. Наиболее значимо выражено различие в остеогенных потенциалах МСК из костного мозга и зародышевой печени. Для МСК, выделенных из органов, забранных в пренатальном периоде, по сравнению с постнатальным периодом, показано более позднее появление признаков старения культуры. Все эксперименты поставлены в достаточном количестве повторов, выводы № 1-3 о сравнительных характеристиках МСК из кроветворных органов достоверны и обоснованы.

Автором впервые предложена концепция формирования кроветворного микроокружения в онтогенезе. МСК, локализованные в транзиторных органах гемопоэза, в пренатальный период характеризуются функциональной незрелостью. Показано, что в этот период МСК мало чувствительны к факторам, вызывающим дифференцировку и главным образом их влияние состоит в трофическом действии на кроветворные клетки. Подавление osteo- и адипогенеза при культивировании МСК на фибронектине свидетельствует о том, что взаимодействие с этим белком может блокировать их дифференцировку в кроветворных органах в пренатальный период развития. Таким образом автором впервые показано, что фибронектин снижает остеогенные потенции МСК костного мозга, а коллаген I типа подавляет его адипогенную дифференцировку.

Паюшина О.В. в своей работе показала межорганные различия в способности МСК к osteo- адипо- и хондрогенезу. Способность к хондрогенезу МСК из печени меняется в ходе развития и коррелирует с активностью гемопоэза. На дифференцировку МСК *in vivo* существенное влияние оказывает микроокружение. Так, МСК из печени зародышей в составе тканевого фрагмента, трансплантированного в почку, дифференцируются в хондрогенном направлении, а в диффузионных камерах – в остеогенном.

Вызывают большой интерес результаты автора по оценке чувствительности МСК, выделенных из зрелого костного мозга и

зародышевой печени к 5-ФУ. Показано, что субпопуляции МСК, резистентные к 5-ФУ, имели пониженный пролиферативный потенциал. Во всех случаях 5-ФУ значительно снижал число колоний, образуемых МСК как костного мозга, так и печени. Под действием 5-ФУ для всех образцов наблюдалась тенденция к снижению средней площади колоний. Полученные результаты отражены в выводах № 4-7, соответствуют полученным результатам и поставленным задачам, изложены чётко и корректно.

3. Ценность для науки и практики проведённой соискателем работы.

Полученные соискателем результаты являются важным научным достижением в клеточной биологии, исследующей фундаментальные аспекты дифференцировочного потенциала МСК, полученных из различных источников и могут быть использованы для совершенствования протоколов культивирования МСК.

В работе впервые проведено комплексное сравнительное исследование МСК костного мозга, печени и селезёнки крысы. Показано, что пластичность МСК зависит от органной принадлежности и стадия развития. Результаты проведённых исследований имеют важное значение для выбора оптимального источника МСК с целью создания клеточного продукта для регенеративной медицины.

Полученные в диссертационной работе Паюшиной О.В. результаты по воздействию 5-ФУ на МСК костного мозга и зародышевой печени показали, что в популяции МСК элиминируются за счёт цитотоксического действия более зрелые клетки. Это может быть использовано для выделения субпопуляции МСК, обладающей более выраженным терапевтическим эффектом.

Исследования Паюшиной О.В. по анализу пролиферативного и дифференцировочного потенциала МСК на компонентах внеклеточного матрикса и в организме животных-реципиентов могут быть использованы

для изучения молекулярных механизмов влияния микроокружения на функционирование МСК.

Таким образом, проведённые исследования и полученные результаты, приведённые в диссертационной работе Паюшиной О.В. важны и с фундаментальной стороны как источник новых знаний в области клеточной биологии, изучающей развитие МСК в условиях микроокружения, так и с прикладной стороны, поскольку содержат результаты, которые могут быть использованы в области клеточной терапии.

4. Содержание диссертации.

Диссертационная работа Паюшиной О.В. построена по традиционному плану, изложена на 328 страницах, состоит из введения, обзора литературы, глав, описывающих материалы и методы, результаты и их обсуждение, заключения, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 886 цитируемых источников. Диссертация носит завершённый характер, хорошо иллюстрирована, содержит 65 рисунка, 19 таблиц и два приложения с иллюстративным материалом.

Цели, задачи, актуальность, научно-практическая значимость проводимого исследования описана во введении. В обзоре литературы достаточно полно представлены современные данные о фенотипических и функциональных характеристиках МСК, локализации и функции МСК в организме. Материалы и методы изложены достаточно подробно, их описание позволяет повторить используемые в работе методики другими исследовательскими коллективами. Описание результатов экспериментов выполнено с высокой степенью детализации, оформлено наглядно, достоверность результатов подтверждена в сериях независимых экспериментов. Экспериментальная часть состоит из логически связанных разделов, в которых автор исследует характеристики клонального роста МСК в первичной культуре. В популяциях клеток из всех полученных источников отмечена значительная гетерогенность по морфологии, иммунофенотипу не

только между колониями, но и между клетками внутри колоний, исследована гетерогенность клеточного состава стромы зародышевой печени, описана дифференцировка МСК *in vitro* и в индукционных средах. Проведён сравнительный анализ субпопуляции МСК, различающихся по чувствительности к 5-ФУ и оценено влияние компонентов внеклеточного матрикса на клональный рост и дифференцировку МСК.

В заключении приведён системный анализ полученных автором в диссертационной работе результатов, показана их важность для разработки новых методов лечения в области клеточной терапии.

Выводы диссертации и положения, выносимые на защиту, базируются на результатах работы, обоснованы и достоверны.

Существенных недостатков у рассмотренной работы не обнаружено, однако к ней имеются отдельные замечания.

Следует отметить небольшое число ссылок в литературном обзоре на статьи последних 2 лет – 2014-2015 гг.

Автором для выявления МСК в колониях КОЕ-Ф в опытах *in vitro* использованы маркеры CD73 и CD90. Желательно было показать наличие CD105, одного из ключевых маркеров МСК и исключить наличие гемопозитических маркеров.

Для индукции остеогенной дифференцировки МСК из различных источников в работе использовали дексаметазон как основной индуктор. Но во многих работах было показано, что этот препарат не является специфическим стимулятором остеогенеза и используется в составе сред для различных дифференцировок, а в ряде случаев наряду с остеогенезом приводит к, например, адипогенезу. В экспериментальных работах других авторов было показано, что эффективным индуктором цитодифференцировки в остеогенном направлении может быть активная форма витамина D₃. Потому нельзя утверждать, что для индукции остеогенного потенциала МСК из печени или селезенки был выбран

эффективный индуктор. Выбор индуктора может объяснять невысокую эффективность дифференцировки исследуемых культур.

Очевидно, что все отмеченные недостатки рассматриваемой диссертации никак не влияют на общую высокую оценку выполненной работы.

5. Опубликование результатов диссертации в научной печати.

Результаты и выводы диссертационной работы Паюшиной О.В. в достаточной степени представлены в печатных работах - опубликовано 21 статья в Российских центральных научных журналах, в том числе 16 в рекомендованных ВАК МОН РФ. Материалы диссертации неоднократно представлялись Паюшиной О.В. на международных и отечественных конференциях.

6. Содержание автореферата.

Содержание автореферата полностью соответствует основным положениям диссертации.

7. Заключение.

Диссертационная работа Паюшиной О.В. «Мезенхимные стромальные клетки из эмбриональных и дефинитивных источников: фенотипические и функциональные особенности», является завершенным исследованием, содержит новую концепцию созревания популяции МСК, происходящего в онтогенезе параллельно с созреванием стволовых кроветворных клеток и приводящего к изменению качества кроветворной ниши.

Диссертационная работа Паюшиной О.В. «Мезенхимные стромальные клетки из эмбриональных и дефинитивных источников: фенотипические и функциональные особенности» имеет важное значение для развития фундаментальных и прикладных аспектов клеточной биологии, цитологии и гистологии и отвечает всем требованиям п. 9 «Положения о порядке

присуждения ученых степеней», утвержденных Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. N 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора биологических наук, а ее автор Паюшина Ольга Викторовна заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.03.04 - клеточной биология, цитология, гистология.

22 октября 2015 г

Зав. лабораторией

генетики стволовых клеток

ФГБНУ «Медико-генетический научный центр»,

(115478, г. Москва, ул.Москворечье, д.1,

www.med-gen.ru, тел. 8 (499)612-86-07,

e-mail оппонента:dvgoldrm7@gmail.com)

доктор биологических наук,

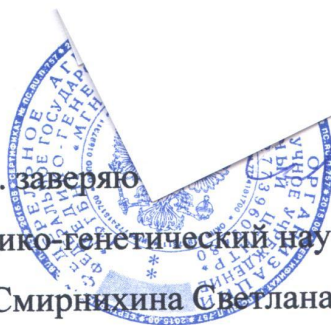
профессор Гольдштейн Дмитрий Вадимович

Подпись д.б.н. Гольдштейна Д.В. заверяю

Ученый секретарь ФГБНУ «Медико-генетический научный центр»

кандидат медицинских наук

Смирнихина Светлана Анатольевна



Сведения об официальных оппонентах:

- Гольдштейн Дмитрий Вадимович

- доктор биологических наук, профессор. Специальность ВАК РФ: 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Наименование организации, являющейся основным местом работы:

Федеральное государственное бюджетное учреждение "Медико-генетический научный центр" Российской академии медицинских наук

Занимаемая должность:

Заведующий лабораторией генетики стволовых клеток

Эл. почта: dvgoldrm7@gmail.com

Телефон: +7 (495)-324-20-24

Список публикаций оппонента по теме диссертации:

1. Бухарова Т.Б., Арутюнян И.В., Шустров С.А., Алексеева И.С., Федюнина И.А., Логовская Л.В., Волков А.В., Ржанинова А.А., Григорьян А.С., Кулаков А.А., **Гольдштейн Д.В.** Тканеинженерная конструкция на основе мультипотентных стромальных клеток жировой ткани и материала «Остеоматрикс» для регенерации костной ткани. Клеточные технологии в биологии и медицине. 2011. № 3. С. 167-173.

2. Федюнина И.А., Ржанинова А.А., Кириенко Е.Е., **Гольдштейн Д.В.** Получение инсулинпродуцирующих клеток из разных популяций мультипотентных стромальных клеток пупочного канатика и жировой ткани человека. Клеточные технологии в биологии и медицине. 2011. № 1. С. 10-16.

3. Новикова Н.И., Ржанинова А.А., Скобцова Л.А., Мурашев А.Н., **Гольдштейн Д.В.** Оценка адекватности биомодели позитивного контроля с использованием опухолевой клеточной культуры Rhabdomyosarcoma для исследования туморогенного потенциала мезенхимальных стромальных клеток. Токсикологический вестник. 2011. № 1. С. 26-31.

4. Арутюнян И.В., Макаров А.В., Фатхудинов Т.Х., Ельчанинов А.В., **Гольдштейн Д.В.**, Большакова Г.Б. Выделение культуры мультипотентных стромальных клеток пупочного канатика крысы методом эксплантов. Клиническая и экспериментальная морфология. 2012. № 3. С. 57-62.

5. Хохлова О.Н., Илюшкина И.А., Фатхудинов Т.Х., Слащёва Г.А., Байкова Ю.П., Большакова Г.Б., Бухарова Т.Б., Туробов В.И., Глинкина В.В., Мурашев А.Н., **Гольдштейн Д.В.** Улучшение сократительной функции сердца крыс с постинфарктным кардиосклерозом после трансплантации моноклеарных и мультипотентных стромальных клеток костного мозга. Клеточные технологии в биологии и медицине. 2012. № 2. С. 73-78.

6. Алексеева И.С., Кулаков А.А., **Гольдштейн Д.В.** Клинический пример использования тканеинженерной конструкции для восстановления костной ткани в области дна верхнечелюстной пазухи. Пародонтология. 2012. Т. 17. № 3. С. 44-47.

7. Алексеева И.С., Рачинская О.А., Волков А.В., Кулаков А.А., **Гольдштейн Д.В.** Сравнительная оценка эффективности образования костной ткани при трансплантации тканеинженерной конструкции и остеопластического материала "Bio-Oss" в области дна верхнечелюстной пазухи. Стоматология. 2012. Т. 91. № 6. С. 41-44.

8. Алексеева И.С., Кулаков А.А., **Гольдштейн Д.В.**, Волков А.В. Восстановление костной ткани после удаления зубов при использовании

тканеинженерной конструкции на основе мультипотентных стромальных клеток жировой ткани. Стоматология. 2012. Т. 91. № 4. С. 32-35.

9. Алексеева И.С., Кулаков А.А., **Гольдштейн Д.В.**, Волков А.В., Шураев А.И. Опыт использования тканеинженерной конструкции для увеличения объема костной ткани на верхней челюсти (срок наблюдения до 21 месяца). Российский биотерапевтический журнал. 2012. Т. 11. № 1. С. 75-77.

10. Алексеева И.С., Кулаков А.А., **Гольдштейн Д.В.**, Волков А.В., Шураев А.И. Результаты клинико-экспериментального исследования по использованию комбинированного клеточного трансплантата на основе мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани для восстановления дефектов костной ткани. Российский биотерапевтический журнал. 2012. Т. 11. № 4. С. 67-69.

11. Бухарова Т.Б., Волков А.В., Антонов Е.Н., Вихрова Е.Б., Попова А.В., Попов В.К., **Гольдштейн Д.В.** Тканеинженерная конструкция на основе мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани, полилактидных носителей и тромбоцитарного геля. Гены и клетки. 2013. Т. 8. № 4. С. 61-68.

12. Бухарова Т.Б., Волков А.В., Воронин А.С., Филимонов К.А., Чаплыгин С.С., Мурушиди М.Ю., Назарян А.К., Задорина А.Ю., Рубинская М.С., Розенбаум А.Ю., Пономарева Ю.В., Фатенкова Е.С., **Гольдштейн Д.В.** Разработка тканеинженерной конструкции на основе мультипотентных стромальных клеток жировой ткани человека, трансфицированных геном костного морфогенетического белка BMP-2. Клиническая и экспериментальная морфология. 2013. № 1 (5). С. 45-51.

13. Логовская Л.В., Бухарова Т.Б., Волков А.В., Вихрова Е.Б., Махнач О.В., **Гольдштейн Д.В.** Индукция остеогенной дифференцировки мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека. Клеточные технологии в биологии и медицине. 2013. № 1. С. 28-33.

14. Бухарова Т.Б., Логовская Л.В., Волков А.В., Гарас М.Н., Вихрова Е.Б., Логунов Д.Ю., Махнач О.В., Шмаров М.М., **Гольдштейн Д.В.** Аденовирусная трансдукция мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека геном костного морфогенетического белка BMP-2. Клеточные технологии в биологии и медицине. 2013. № 3. С. 127-131.

15. Омельченко Д.О., Ржанинова А.А., **Гольдштейн Д.В.** Сравнительный парный анализ транскриптома спонтанно трансформированных мультипотентных стромальных клеток жировой ткани человека. Генетика. 2014. Т. 50. № 1. С. 106-115.

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук Сабуриной Ирины Николаевны на диссертационную работу Паюшиной Ольги Викторовны «*Мезенхимные стромальные клетки из эмбриональных и дефинитивных источников: фенотипические и функциональные особенности*», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология в Диссертационный совет Д.501.001.52 при Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова.

Актуальность темы исследования

Исследование биологии мезенхимных стромальных клеток (МСК) играет в современной клеточной биологии важную роль не только для получения новых знаний, но и открывает пути и способы репарации тканей и органов, которые ведут к открытию новых прорывных технологий в регенеративной медицине.

Среди негемопозитических клеток, используемых для клеточной терапии, наибольшее применение находят мезенхимные стромальные клетки, выделенные из разных источников. Считается, что пул этих клеток выполняет роль неприкосновенного запаса для физиологической и репаративной регенерации. Но до сих пор происхождение в онтогенезе и функции МСК в постнатальном периоде в норме и при патологии остаются недостаточно изученными. Объясняется это тем, что морфологически МСК трудно идентифицировать *in situ*, т.к. они относятся к популяции низкодифференцированных клеток и характеризуются «минимальным фенотипом». Под влиянием сигналов микроокружения МСК дифференцируются, поддерживая пул прогениторных и терминально специализированных клеток. С возрастом общее количество МСК в органах существенно уменьшается. Показано, что в костном мозге человека после рождения 1 МСК приходится на 10000 гемопоэтических клеток, у подростков 1 МСК на 100000 гемопоэтических, в костном мозге пожилых людей 1 МСК на 500000 и у людей старше 70 лет 1 МСК на 1 млн гемопоэтических клеток.

МСК широко исследуют и активно применяют в экспериментальных и клинических испытаниях. Клетки с характеристиками МСК выделяют из разных тканей и органов, но множество вопросов относительно получения, выращивания, фенотипирования, судьбы клеток *in vivo* и возможных механизмов их участия в репаративных процессах при повреждении по-прежнему остаются открытыми.

В настоящее время для идентификации МСК используют известные антитела, однако ни один тип или комбинация антител полностью не распознает фенотип, уникальный для МСК, и не позволяет выделить культуру клеток, насыщенную ранними предшественниками и имеющую предсказуемый больший потенциал роста и дифференцировки или более высокую активность для максимального терапевтического эффекта. Это можно объяснить использованием различных протоколов, методик или оборудования с различной чувствительностью для анализа (например, проточная цитометрия по сравнению с иммуноцитохимическими исследованиями; использование фиксированных клеток по сравнению с нативными), использованием различных клонов антител. Стандартизировать протоколы выделения, культивирования, направленной дифференцировки и последующей характеристики очень сложно, не смотря на то, что МСК, выделенные из различных органов и тканей похожи по морфологии, иммунофенотипу и дифференцировочному потенциалу. До сих пор нет однозначного ответа относительно их происхождения в онтогенезе, эпителио-мезенхимной пластичности, а также принципиальной организации возможного дифферона, как последовательного ряда клеточных форм со специфическими для каждой формы потенциальными к дифференцировке и размножению. Возможно, изучение структуры гистогенетического ряда МСК в индивидуальном развитии поможет объяснить их популяционную гетерогенность, что необходимо не только для более глубокого

понимания биологии МСК, но и для более эффективного их применения в клеточной терапии и для тканевой инженерии.

Все выше изложенное определило особую актуальность выбранного автором направления исследований, которое посвящено сравнительному исследованию фенотипических и функциональных особенностей мезенхимных стромальных клеток из эмбриональных и дефинитивных источников.

Общая характеристика и степень достоверности результатов проведенного исследования

Диссертационная работа Паюшиной О.В. изложена на 328 страницах, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследований, результатов и обсуждения, заключения, выводов и двух приложений с иллюстративным материалом. Работа содержит 19 таблиц и иллюстрирована 65 рисунками. Список литературы включает 886 источников, 60 из которых отечественные.

Работа написана хорошим языком, легко читается и воспринимается за счет правильного расположения рисунков и таблиц в тексте. Во введении автор обосновывает актуальность работы, четко ставит цель и конкретные задачи исследования, определяет ее новизну, теоретическую и практическую значимость. В 1 главе диссертации «Обзор литературы» полно представлены разделы, освещающие историю открытия, номенклатуру и критерии МСК, основные фенотипические и функциональные характеристики, локализацию и функции МСК в организме, а также проблемы их использования в регенеративной медицине с ссылками на большое количество источников (886). Это убедительно демонстрирует, что автор прекрасно владеет тематикой данного исследования. В главе «Результаты и обсуждение» материал изложен четко, последовательно, иллюстрирован хорошими фотографиями. Приведенные таблицы лаконичны и существенно облегчают ознакомление с материалом работы.

Степень достоверности обеспечивается достаточным числом наблюдений, обоснованным выбором большого количества различных использованных методов исследования, как классических, так и современных, и использованием статистических методов для обработки полученных данных. Это свидетельствует о высоком методическом уровне и трудоемкости работы, сделанной автором.

Для сравнительного исследования автор использовал МСК из кроветворных органов: костного мозга, печени и селезенки, на разных стадиях онтогенеза. Это продуманный и удачный выбор модели для исследования, так как, несмотря на широкую распространенность МСК в организме, именно в этих органах они имеют исключительное функциональное значение на протяжении всего индивидуального развития. МСК в этих органах гемопоэза составляют основу для микроокружения и нормально протекающего процесса кроветворения. МСК не только обеспечивают цитоархитектонику органов, но и взаимодействуя с кроветворными клетками, выделяют разнообразные факторы роста и цитокины, регулирующие пролиферацию и дифференцировку последних.

Работа представляет собой многоплановое исследование, включающее как эксперименты *in vitro* на клеточных культурах, так и целую серию экспериментов *in vivo* на животных. Используемые для исследования клеточные культуры МСК представляют собой уникальную, современную и достоверную модель для сравнительного изучения фенотипических и функциональных особенностей МСК. Использование этого метода позволило проанализировать клеточный состав стромы костного мозга, печени и селезенки половозрелых животных и зародышей, оценить пролиферативную активность, морфологические и фенотипические изменения в процессе пассирования клеточных культур МСК в зависимости от органной принадлежности и стадии онтогенеза, а так же исследовать влияние адгезивных взаимодействий МСК с различными компонентами внеклеточного матрикса на их клональный рост и дифференцировку.

Для сопоставления и подтверждения результатов, полученных в экспериментах на клеточных культурах *in vitro*, автор использовал метод трансплантации на экспериментальных животных, который с успехом используется для определения дифференцировочного потенциала мезенхимных клеток. Использование нескольких методических приемов в эксперименте *in vivo*, таких как эктопическая трансплантация эмбриональной печени разного срока развития (14-, 16- и 20-суточных плодов), трансплантация клеток в диффузионных камерах и трансплантация клеток на носителях, позволили оценить влияние условий микроокружения на реализацию потенциалов МСК из разных органов к дифференцировке.

Использование автором цитотоксического препарата избирательного действия, поражающего клетки в зависимости от степени их зрелости или фазы клеточного цикла позволило проанализировать чувствительность МСК костного мозга и зародышевой печени к цитотоксическому действию 5-ФУ и сравнить потенциалы субпопуляций МСК, что, возможно, поможет пролить свет на иерархическую организацию популяций МСК.

Диссертация завершается обсуждением, в котором автор обобщает полученные результаты в логическую схему, что позволяет рассматривать полученные в работе выводы как непосредственно вытекающие из задач исследования.

Научная новизна и теоретическая значимость работы

Научная новизна и достоверность результатов не вызывает сомнения. В соответствии с поставленной целью автором решался ряд задач, позволивших в итоге получить новые знания о процессе формирования кроветворной ниши и предложить новую концепцию, согласно которой в пренатальный период МСК не способны отвечать на сигналы, вызывающие дифференцировку, и их роль в поддержании гемопоэза состоит главным образом в трофическом влиянии на кроветворные клетки. Созревание МСК в ходе дальнейшего развития отражается на клеточном составе кроветворной ниши и может иметь определяющее влияние на приобретение стволовыми кроветворными клетками дефинитивных свойств, в частности, на их переход от активного размножения в печени зародыша к состоянию покоя и самоподдержания в зрелом костном мозге.

Показано, что не смотря на морфологическое сходство МСК из всех изученных органов и их способность к клональному росту, между ними существуют фенотипические различия в зависимости от органной принадлежности и стадии онтогенеза.

С использованием экспериментальной модели трансплантации клеток в перитонеальную полость животных-реципиентов в диффузионных камерах впервые оценены потенциалы МСК из печени зародышей крысы к дифференцировке в сравнении с таковыми из зрелого костного мозга и показано, что образование костной ткани при помещении в диффузионную камеру суспензии свежевыделенных клеток зародышевой печени происходит лишь в редких случаях.

В экспериментах по анализу влияния компонентов внеклеточного матрикса на дифференцировку МСК костного мозга автором впервые показано ингибирование остеогенеза при их культивировании на фибронектине и идентифицирован ответственный за это участок молекулы фибронектина.

Получены также новые данные о потенциалах субпопуляций МСК, устойчивых к цитотоксическому воздействию 5-ФУ, к пролиферации и дифференцировке, что говорит о неодинаковой структуре популяций МСК в сравниваемых органах, указывая на неодинаковое содержание в этих популяциях клеток различной степени зрелости.

Замечание. В экспериментах на животных при трансплантации клеток в диффузионных камерах брали в одном случае МСК костного мозга и зародышей печени крысы 100 млн свежевыделенных клеток, в другом только 1 млн размноженных *in vitro*. Хотелось бы узнать, почему такая разница в количестве трансплантированных клеток и насколько достоверны результаты.

Заключение

Диссертационная работа Паюшиной Ольги Викторовны «Мезенхимные стромальные клетки из эмбриональных и дефинитивных источников: фенотипические и функциональные особенности», представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук, является законченной научно-квалификационной работой, в результате выполнения которой получены новые данные о процессе формирования дефинитивной популяции мезенхимных стромальных клеток как ключевого компонента кроветворного микроокружения.

Содержание автореферата, а также опубликованные статьи, в том числе 16 статей, представленных в научных изданиях, рекомендованных ВАК отражают основные результаты, положения и выводы диссертации.

По актуальности, научной новизне и практической значимости диссертационная работа Паюшиной Ольги Викторовны «Мезенхимные стромальные клетки из эмбриональных и дефинитивных источников: фенотипические и функциональные особенности» полностью соответствует квалификационным требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842, с изменениями и дополнениями от 30 июля 2014 года, предъявляемым к докторским диссертациям, а соискатель, Паюшина Ольга Викторовна, заслуживает присуждения искомой степени доктора биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология.

Зав. лабораторией клеточной биологии и патологии развития
ФГБНУ «НИИ ОПП»,
доктор биологических наук
saburina@mail.ru (499)151-17-56

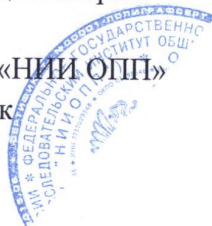
И.Н. Сабурина

Подпись Сабуриной И.Н. удостоверяю

« 20 « октября 2015г.

Ученый секретарь ФГБНУ «НИИ ОПП»
Кандидат медицинских наук

Л.Н. Скуратовская



Сведения об официальных оппонентах:

- Сабурина Ирина Николаевна

- доктор биологических наук. Специальность ВАК РФ: 14.00.16 – патологическая физиология, 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Наименование организации, являющейся основным местом работы:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

Занимаемая должность:

Заведующая лабораторией клеточной биологии и патологии развития

Эл. почта: niiopp@mail.ru

Телефон: +7 (499)-151-17-56

Список публикаций оппонента по теме диссертации:

1. Сергеев С.А., Храмова Ю.В., Семенова М.Л., **Сабурина И.Н.**, Кошелева Н.В. Поведение мультипотентных клеток, трансплантированных *in vitro* в поврежденную сетчатку глаза. Acta Naturae (русскаяязычная версия). 2011. Т. 3. № 4. С. 68-75.

2. Орлов А.А., **Сабурина И.Н.**, Репин В.С., Новикова Н.И., Мурашов А.Н., Иванов Д.В., Горелик Е.И. Экспериментальное моделирование 3-D заданного остеогенеза костной ткани на базе аутологичных культур мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток крыс и остеопластических материалов для устранения дефектов кости. Вестник новых медицинских технологий. 2011. Т. 18. № 1. С. 7-11.

3. Петерсен Е.В., Трусова И.А., Зурина И.М., Кошелева Н.В., Горкун А.А., Гуллер А.Е., Пулин А.А., **Сабурина И.Н.**, Репин В.С., Шехтер А.Б. Использование трансплантируемых мезенхимальных клеток для лечения рубцов и коррекции возрастных изменений кожи. Механизм клинических эффектов. Клинико-экспериментальное исследование. Пластическая хирургия и косметология. 2012. № 4. С. 615-625.

4. Горкун А.А., **Сабурина И.Н.**, Кошелева Н.В., Пулин А.А., Комиссарова С.В., Репин В.С., Иванов Д.В. Индукция васкулогенеза в сфероидах из стромальных клеток пупочного канатика. Вестник новых медицинских технологий. 2012. Т. XIX. № 2. С. 313-315.

5. Горкун А.А., **Сабурина И.Н.**, Кошелева Н.В., Зурина И.М., Пулин А.А., Шагидулин М.Ю., Онищенко Н.А., Репин В.С. Эндотелиальные прогениторные клетки в мезенхимосфероидах пупочного канатика и их участие в процессах ангиогенеза и васкулогенеза при острой печеночной недостаточности. Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2012. № 4. С. 50-53.

6. Диланян М.Х., Новикова Н.И., Орлов А.А., **Сабурина И.Н.**, Репин В.С., Евсеенков Э.Е. Морфологическое исследование динамики замещения костного цемента Norian CRS® Fast Set™ de novo костной тканью на модели направленной

остеоинтеграции нижней челюсти у крыс CD. Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2012. № 4. С. 113-116.

7. **Сабурина И.Н.**, Горкун А.А., Зурина И.М., Кошелева Н.В., Репин В.С. Изучение ангиогенного потенциала мультипотентных мезенхимных стромальных клеток человека. Патогенез. 2013. Т. 11. № 1. С. 60-63.

8. Шагидулин М.Ю., Горкун А.А., Онищенко Н.А., Крашенинников М.Е., Ильинский И.М., Можейко Н.П., Башкина Л.В., **Сабурина И.Н.**, Севастьянов В.И., Готье С.В. Использование МСК различной онтогенетической зрелости для коррекции хронического фиброзирующего повреждения печени. Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2013. Т. XV. № 3. С. 73-82.

9. Сорокин Г.В., Боровков В.Н., Еремин А.В., Орлов А.А., **Сабурина И.Н.** Стимуляция репаративной регенерации при лечении переломов конечностей с применением новых биотехнологий. Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2013. № 3. С. 81-86.

10. Орлов А.А., **Сабурина И.Н.**, Диланян М.Х., Скуратовская Л.Н., Репин В.С., Серебрикова Л.Е., Житков М.Ю., Евсеенков Э.Е. Динамика формирования костной ткани у крыс под действием нового остеопластического материала «NORIAN». Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2013. № 1. С. 61-64.

11. Орлов А.А., **Сабурина И.Н.**, Сысоев С.Д., Григорьян А.С. Влияние трансплантации аутогенных мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани на течение остеогенетического процесса (экспериментальное исследование). Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2014. № 1. С. 3-7.

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Паюшиной Ольги Викторовны на тему «Мезенхимные стромальные клетки из эмбриональных и дефинитивных источников: фенотипические и функциональные особенности», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.03.04 - клеточная биология, цитология, гистология

Актуальность темы исследования

В настоящее время мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (МСК) являются одним из наиболее активно исследуемых типов стволовых и родоначальных клеток, что в немалой степени связано с их привлекательностью для применения в клеточной терапии и тканевой инженерии. Хотя исследование стволовых клеток стромы имеет долгую историю, начинающуюся с их описания А.Я. Фриденштейном в 1968 году, характеристика этих клеток далека от завершения. В частности, до сих пор остается без ответа вопрос о том, насколько широк их дифференцировочный потенциал. В последнее время появились работы о возможности их дифференцировки не только в мезенхимальные производные, но и в гепатоциты, нейроны и т.п., однако есть также немало статей, доказывающих обратное. Мало известно также об иммунофенотипе МСК, противоречивы сведения об их способности к самоподдержанию. Отчасти это объясняется гетерогенностью данной популяции и ее сложной структурой, которая к настоящему времени изучена далеко не полностью. Диссертация О.В. Паюшиной посвящена вопросу о том, как популяция МСК формируется в онтогенезе и как характеристики стромальных клеток различных кроветворных органов развивающегося и зрелого организма соотносятся с активностью гемопоэза. Поскольку стволовые клетки стромы играют ключевую роль в организации кроветворного микроокружения, анализ зависимости их характеристик от органной принадлежности и стадии индивидуального развития важен для лучшего понимания не только биологии стромальных предшественников как представителей тканеспецифических стволовых клеток, но и механизмов

регуляции гемопоэза. Таким образом, выбранное Паюшиной О.В. направление диссертационного исследования представляет несомненную актуальность.

Научная новизна исследований и полученных результатов

Новизна полученных результатов заключается прежде всего в том, что автором впервые проведено детальное сравнение популяций МСК из основных органов эмбрионального и дефинитивного кроветворения по широкому набору критериев, включая клоногенные и адгезивные свойства, морфологию клеток, их пролиферативную активность, присутствие поверхностных маркеров, потенции к дифференцировке *in vitro* и *in vivo*. На основании выявленных закономерностей, характеризующих зависимость свойств стромальных клеток от их локализации и стадии развития, предложена концепция функционального созревания МСК, которая с учетом ключевой роли этих клеток в создании кроветворной ниши позволяет по-новому взглянуть на процесс становления дефинитивного гемопоэза. К наиболее существенным новым результатам данного исследования можно также отнести выявление функциональных особенностей устойчивых к 5-фторурацилу субпопуляций МСК в зависимости от их органной принадлежности и стадии онтогенеза. Автором впервые показано, что резистентные к этому препарату МСК из костного мозга половозрелых крыс и печени зародышей сходны между собой в том, что имеют сниженный пролиферативный потенциал, но при этом различаются по длительности сохранения способности к остеогенезу *in vitro*. Новыми результатами являются также обнаруженные автором подавление остеогенной дифференцировки МСК костного мозга под влиянием адгезивных взаимодействий с фибронектином и проявление клетками зародышевой печени потенций к образованию кости *in vivo* в диффузионных камерах. Кроме того, в работе впервые изучена потенциальная возможность использования ряда материалов (в частности, агарозных и диметилакриламидных криогелей) для создания тканеинженерных конструкций на основе МСК, а именно оценена совместимость этих материалов с организмом реципиента и эффективность их заселения клетками. Полученные данные открывают

перспективы для дальнейшего совершенствования методов применения МСК в тканевой инженерии.

Достоверность результатов и обоснованность выводов

Работа выполнена на высоком уровне, с использованием широкого спектра методов. Эксперименты поставлены на большом количестве материала, с соблюдением всех контролей, полученные данные проанализированы статистически, что не позволяет сомневаться в их достоверности. Сформулированные автором выводы согласуются с заявленной целью исследования, четко соответствуют поставленным конкретным задачам и в полной мере обоснованы результатами проведенных исследований.

Практическая значимость полученных результатов

Результаты проведенного О.В. Паюшиной исследования имеют несомненную ценность прежде всего для фундаментальной науки, расширяя представления о биологии МСК и процессе становления дефинитивной популяции этих клеток в ходе индивидуального развития организма. Вместе с тем они могут представлять и практический интерес, прежде всего с точки зрения развития клеточных технологий, входящих в перечень критических технологий Российской Федерации. Автор не только провела всесторонний сравнительный анализ свойств МСК из нескольких органов плода и половозрелого организма, результаты которого могут быть учтены при выборе источников клеток для применения в медицине, но и получила новые данные о влиянии микроокружения МСК на их рост и дифференцировку, полезные для разработки оптимальных методик культивирования этих клеток в научных и практических целях. Кроме того, материал данной диссертации может быть использован в образовательном процессе как основа лекций для студентов медицинских и биологических специальностей.

Содержание работы

Диссертационная работа изложена на 328 страницах, построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и обсуждения,

заклучения и выводов, списка литературы. В работе имеются два приложения с иллюстративным материалом.

Во **введении** кратко описано современное состояние дел в области изучения МСК, обоснована актуальность избранной темы, сформулированы цели и задачи исследования, а также положения, выносимые на защиту, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы. Приведены сведения об апробации результатов, личном вкладе автора и числе публикаций по материалам диссертации.

Обзор литературы изложен на 70 страницах и состоит из 5 разделов, в которых автор рассматривает самые разнообразные аспекты исследования МСК – историю их открытия, фенотипические характеристики, особенности роста и дифференцировки в культуре, структуру популяции, возможности использования в регенеративной медицине. В соответствии с целью работы – выявлением органотипических особенностей МСК как клеток, организующих кроветворное микроокружение, в различных органах транзитного и дефинитивного гемопоэза – значительная часть обзора посвящена стромальной регуляции гемопоэза и роли МСК кроветворных органов в его поддержании. Автором проанализирован большой объем литературы, список цитируемых публикаций включает 886 источников.

В главе «**Материалы и методы**» подробно описаны разнообразные методические подходы, использованные для решения поставленных задач – культивирование клеток, несколько моделей экспериментальной трансплантации, методы цитохимического, иммуноцитохимического и молекулярно-генетического анализа.

Глава «**Результаты и обсуждение**», состоящая из 7 разделов, представляет собой детальное изложение полученных экспериментальных данных, их анализ и сопоставление с имеющимися в литературе сведениями. Прежде всего автор охарактеризовала клональный рост МСК из костного мозга, печени и селезенки на разных стадиях онтогенеза в первичной культуре и показала, что эффективность клонирования и фенотип стромальных клеток коррелируют с кроветворной активностью органов, из которых они получены. Далее, обратив внимание на

морфологическую гетерогенность первичных культур зародышевой печени, О.В. Паюшина занялась выяснением клеточного состава этих культур и дала детальную характеристику присутствующих в них миофибробластов, эпителиоцитов и предшественников скелетных мышц. Логичным следствием обнаружения примеси этих клеток, загрязняющих культуру МСК и исчезающих в ходе ее последующего пересева, стал переход к изучению свойств стромальных клеток в пассируемых культурах, более гомогенных по сравнению с первичными. Было показано, что в течение первых нескольких пассажей стромальные клетки из всех изучаемых органов, несмотря на снижение пролиферативной активности, сохраняют фенотип, свойственный МСК. При культивировании в индукционных средах продемонстрировано, что потенции к характерным для МСК дифференцировкам – адипогенной, хондрогенной и особенно остеогенной – у клеток из костного мозга выражены в большей степени, чем у клеток из печени или селезенки. Далее автор переходит к исследованию влияния на МСК костного мозга и зародышевой печени цитотоксического препарата избирательного действия 5-фторурацила и обнаруживает различия в остеогенных потенциях устойчивых к нему субпопуляций стромальных клеток в зависимости от их источника. На основании выявленных фактов сделано предположение о возможных различиях в структуре популяций стромальных клеток в костном мозге половозрелого организма и печени зародыша. Следующий раздел посвящен изучению адгезивных взаимодействий стромальных клеток с компонентами внеклеточного матрикса. Здесь наиболее существенными результатами являются обнаруженные различия в динамике прикрепления к субстрату клоногенных МСК костного мозга и зародышевой печени, а также ингибирующее влияние фибронектина и коллагена на дифференцировку МСК. Большой фундаментальный и практический интерес представляет часть работы, содержащая описание трансплантации МСК экспериментальным животным и их культивирования на носителях. Автор показала, что судьба МСК в организме реципиента определяется как источником клеток, так и условиями микроокружения – присутствием

других клеточных элементов трансплантируемой ткани, сохранностью ее структуры, наличием или отсутствием стадии предварительного культивирования *in vitro*. При тестировании разнообразных носителей для МСК были выявлены наиболее перспективные из них и намечены возможные пути к повышению эффективности их применения.

В **заключении** диссертации О.В. Паюшина анализирует обнаруженные ею различия в свойствах популяций МСК в зависимости от их локализации, стадии онтогенеза и кроветворной активности органов, и на основании выявленных закономерностей формулирует концепцию происходящего в онтогенезе функционального созревания МСК как организаторов кроветворного микроокружения. Обсуждаются также вопросы, связанные со значением полученных результатов для регенеративной медицины, и перспективы дальнейших исследований.

В целом работа О.В. Паюшиной выполнена на высоком научном уровне, имеет четкую и логичную структуру. В качестве замечаний следует отметить некоторую многословность выводов и недостаточно высокое качество некоторых микрофотографий, иллюстрирующих полученные результаты. Можно было бы несколько сократить описание морфологии колоний, образуемых клетками из различных источников в первичной культуре (стр. 103-104). Кроме того, вызывает сожаление то обстоятельство, что, несмотря на неоднократно подчеркиваемую автором ключевую роль МСК в организации кроветворной ниши, в работе отсутствует анализ влияния стромальных клеток из исследуемых источников на гемопоэз. Такой анализ мог бы значительно украсить работу и придать ей логическую завершенность; впрочем, в заключении диссертации автор обозначила его в качестве одной из перспектив дальнейших исследований. Указанные недостатки не снижают ценности полученных результатов и общего благоприятного впечатления от работы. Содержание диссертации адекватно отражено в автореферате.

Заключение

Таким образом, диссертация Паюшиной Ольги Викторовны «Мезенхимные стромальные клетки из эмбриональных и дефинитивных источников: фенотипические и функциональные особенности» является

научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований разработаны теоретические положения, совокупность которых можно квалифицировать как новое научное достижение в области клеточной биологии, цитологии и гистологии. Работа соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а ее автор заслуживает присуждения искомой ученой степени.

Заведующий лабораторией
стромальной регуляции иммунитета
ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи»
Минздрава России,
доктор медицинских наук

Р.К. Чайлахян

Подпись Р.К. Чайлахяна заверяю:

Ученый секретарь
ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи»
Минздрава России,
кандидат биологических наук

Л.К. Кожевникова

20.10.2015 г.



Сведения об официальных оппонентах:

- Чайлахян Рубен Карпович

- доктор медицинских наук. Специальность ВАК РФ: 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология

Наименование организации, являющейся основным местом работы:

Федеральное государственное бюджетное учреждение "Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи" Министерства здравоохранения Российской Федерации

Занимаемая должность:

Заведующий лабораторией стромальной регуляции иммунитета

Эл. почта: rubenchail@yandex.ru

Телефон: +7 (499)-193-61-02

Список публикаций оппонента по теме диссертации:

1. **Чайлахян Р.К.**, Юсупов В.И., Герасимов Ю.В., Соболев П.А., Тамбиев А.Х., Воробьева Н.Н., Свиридов А.П., Баграташвили В.Н. Влияние гидродинамических процессов и низкоинтенсивного излучения с длинами волн 0,63 мкм и 7,1 мм на пролиферативную активность стволовых клеток стромы костного мозга *in vitro*. Биомедицина. 2011. Т. 1. № 2. С. 24-29.

2. Лосева Е.В., Подгорный О.В., Полтавцева Р.А., Марей М.В., Логинова Н.А., Курская О.В., Сухих Г.Т., **Чайлахян Р.К.**, Александрова М.А. Эффекты нейротрансплантации культивируемых нейральных и мезенхимальных стволовых клеток человека на обучение и состояние мозга крыс после гипоксии. Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 2011. Т. 97. № 2. С. 155-168.

3. Бычков А.И., Царев В.Н., **Чайлахян Р.К.**, Иванов А.С., Алешин А.Н. Исследование поверхностной структуры и антибактериальной активности модифицированного остеопластического материала «Остеодент» в эксперименте. Клиническая стоматология. 2011. № 4 (60). С. 40-44.

4. **Chailakhyan R.K.**, Galoyan A.A., Gerasimov Yu.V., Stepanova E.V., Chailakhyan M.R., Solomko E.Sh. Effect of proline-rich polypeptide on various lines of tumour cells, normal bone marrow and giant-cell tumour stromal tissue. Biopolymers and cell. 2011. Т. 27. № 5. С. 347-349.

5. Горская Ю.Ф., Данилова Т.А., Мезенцева М.В., Шаповал И.М., **Чайлахян Р.К.**, Герасимов Ю.В., Наровлянский А.Н., Нестеренко В.Г. Продукция цитокинов стромальными клетками костного мозга и селезенки под влиянием препаратов микробных клеток *in vitro*. Иммунология. 2011. Т. 32. № 5. С. 236-239.

6. **Чайлахян Р.К.**, Юсупов В.И., Свиридов А.П., Герасимов Ю.В., Тамбиев А.Х., Воробьева Н.Н., Куралесова А.И., Москвина И.Л., Баграташвили В.Н. Акустическое и КВЧ-воздействия на стволовые стромальные клетки костного мозга *in vitro*. Биомедицинская радиоэлектроника. 2013. № 2. С. 036-042.

7. Горская Ю.Ф., Данилова Т.А., Мезенцева М.В., Шаповал И.М., Грунина Т.М., Бартов М.С., Карягина А.С., Лунин В.Г., **Чайлахян Р.К.**, Куралесова А.И., Герасимов

Ю.В., Нестеренко В.Г. Влияние BMP-2 на численность и остеогенные свойства мультипотентных стромальных клеток и экспрессию генов цитокинов в первичных культурах клеток костного мозга и селезенки мышей СВА, иммунизированных бактериальными антигенами. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2013. Т. 155. № 5. С. 602-606.

8. **Чайлахян Р.К.**, Аверьянов А.В., Забозлаев Ф.Г., Соболев П.А., Сорокина А.В., Акульшин Д.А., Герасимов Ю.В. Сравнительное исследование эффективности трансплантации мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга, культивированных в условиях нормоксии и гипоксии, и их кондиционированных сред на модели острого повреждения легких. Клеточные технологии в биологии и медицине. 2014. № 1. С. 25-30.

9. **Чайлахян Р.К.**, Юсупов В.И., Горская Ю.Ф., Куралесова А.И., Герасимов Ю.В., Свиридов А.П., Тамбиев А.Х., Воробьева Н.Н., Грошева А.Г., Шишкова В.В., Москвина И.Л., Баграташвили В.Н. Эффекты акустического и КВЧ-воздействия на мультипотентные стромальные клетки при формировании гетеротопных костномозговых органов в тканеинженерных конструкциях. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2014. Т. 158. № 11. С. 640-644.