

Министерство науки и высшего образования  
Российской Федерации



Федеральное государственное  
бюджетное научное учреждение  
«Научно-исследовательский институт  
комплексных проблем  
сердечно-сосудистых заболеваний»  
(НИИ КПССЗ)

бульвар имени академика Л.С. Барбараша, стр. 6,  
г. Кемерово, Кемеровская область – Кузбасс, 650002  
тел. 8 (3842) 643-308, факс 8 (3842) 643-410  
e-mail: [reception@kemcardio.ru](mailto:reception@kemcardio.ru)  
[www.kemcardio.ru](http://www.kemcardio.ru)  
ОКПО 55608705; ОГРН 1034205024479;  
ИНН/КПП 4205012290/420501001

№ \_\_\_\_\_  
на № \_\_\_\_\_ от \_\_\_\_\_

«УТВЕРЖДАЮ»  
Директор Федерального  
государственного бюджетного  
научного учреждения  
«Научно-исследовательский  
институт комплексных проблем  
сердечно-сосудистых  
заболеваний»,  
академик РАН О.Л. Барбараш



\_\_\_\_\_ 2024 г.

## ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» на диссертационную работу Докшина Павла Михайловича «Notch-зависимые механизмы функциональной регуляции мезенхимных клеток сердца при остром инфаркте и пороках развития», представленную в диссертационный совет на базе Федерального государственного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.22. Клеточная биология.

### Актуальность исследования

Исследование молекулярных механизмов регуляции мезенхимных клеток в миокарде при инфаркте и врожденных пороках сердца имеет важное значение для понимания процессов развития и восстановления сердечной ткани. Сигнальный путь Notch, задействованный в регуляции свойств мезенхимных клеток, играет ключевую роль в ремоделировании тканей сердца, однако молекулярные и клеточные механизмы вовлечения сигнального пути Notch в данный патологический процесс остаются малоизученными. Диссертация Павла Михайловича Докшина посвящена комплексному изучению Notch-зависимых механизмов регуляции мезенхимных клеток сердца при индуцированной гипоксии *in vitro*, инфаркте миокарда и тетраде

Фалло, характеризуется высокой актуальностью и значимостью для клеточной биологии и регенеративной медицины.

### **Научная новизна**

Впервые установлен молекулярный профиль изменения экспрессии ключевых генов сигнального пути Notch и их роль в активации мезенхимных клеток сердца в условиях гипоксии *in vitro* и *in vivo*. Автором определены механизмы взаимодействия сигнальных путей Notch и BMP в контексте эндотелиально-мезенхимного перехода, что позволило установить новые аспекты их регуляторных функций. Получены оригинальные данные о нарушении регуляции сигнального пути Notch в мезенхимных клетках сердца при тетраде Фалло. Это расширяет представления о механизмах развития врожденных пороков сердца и может способствовать разработке новых молекулярно-терапевтических подходов.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Работа предоставляет новые данные о механизмах регенерации миокарда и соответствующей функциональной роли мезенхимных клеток сердца. Теоретическая значимость диссертации заключается в получении новых фундаментальных знаний о регуляции межклеточных взаимодействий в сердечной ткани, а также в расшифровке механизмов влияния Notch-пути на эти процессы. Практическая значимость работы определяется перспективами использования фармакологических регуляторов сигнального пути Notch для стимуляции регенерации миокарда, что может быть применено в лечении хронической сердечной недостаточности.

### **Методы работы и оценка достоверности результатов**

В диссертации П.М. Докшина использован широкий спектр современных методов биомедицины и клеточной биологии: гено- и клеточно-инженерные технологии (культивирование мезенхимных клеток сердца и эндотелиальных клеток, лентивирусная трансдукция), молекулярно-генетический анализ (ПЦР с детекцией в реальном времени, секвенирование РНК), различные методы биоинформатического анализа, иммуоцитохимическое окрашивание. Достоверность данных подтверждена их воспроизводимостью в различных экспериментах, большим объемом выполненной экспериментальной работы и публикациями в рецензируемых журналах.

### **Общая характеристика работы**

Диссертация состоит из введения, трёх глав, заключения, выводов, списка сокращений и литературы, включает 149 страниц текста и 11 таблиц, проиллюстрирована 45 рисунками. Список литературы содержит 229 источников, большая часть которых опубликованы в течение последних 5 лет. Это демонстрирует знакомство диссертанта с актуальной литературой по проблеме, а также проведение диссертантом ретроспективного анализа для углубленного

изучения истории развития ключевых концепций в данной области.

**Во введении** четко сформулированы актуальность темы, цель исследования, задачи, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы. Основные положения, выносимые на защиту, логично связаны с результатами исследований.

## **Глава 1. Обзор литературы**

Автор провел достаточно глубокий анализ литературных данных о формировании сердца в ходе эмбриогенеза, значении сигнального пути Notch, его взаимодействии с другими сигнальными путями (в частности, BMP), роли сигнального пути Notch в развитии сердца, этиологии и патогенезе тетрады Фалло, механизмах поддержания гомеостаза и регенерации сердца, а также о мезенхимных клетках сердца и их роли в регенерации миокарда. Существующие знания о мезенхимных клетках сердца разобраны особенно детально: изложены открытие стволовых клеток сердца, фенотипы резидентных клеток-предшественников сердца (c-Kit<sup>+</sup>, Isl-1<sup>+</sup>, Sca-1<sup>+</sup>, колониеформирующих фибробластов сердца), роль и механизмы участия сигнального пути Notch в регуляции свойств мезенхимных клеток сердца и развитии эндотелиально-мезенхимного перехода. Разделы обзора литературы иллюстрированы наглядными и информативными графическими схемами, дополняющими текст и значительно упрощающими ознакомление с авторским изложением. Особое внимание уделено механизмам Notch-зависимого эндотелиально-мезенхимного перехода, Notch-зависимым патологическим процессам при инфаркте миокарда и врожденных пороках сердца, а также Notch-зависимым клеточным процессам, важным для саногенеза и регенерации миокарда. Характер составления обзора литературы и концептуальность авторского изложения оставляет положительное впечатление и свидетельствует о высокой эрудиции соискателя.

## **Глава 2. Материалы и методы**

В разделе детально представлены экспериментальные подходы, включающие описание выборки пациентов, лабораторных животных и клеточных культур, индукцию инфаркта миокарда у лабораторных животных, выделение мезенхимных клеток сердца крыс и человека и их дифференцировку в трех направлениях, сокультивирование эндотелиальных клеток пупочной вены и мезенхимных клеток сердца человека, создание специализированных плазмид и лентивирусную трансдукцию, иммуноцитохимическое окрашивание, анализ генной экспрессии при помощи ПЦР с детекцией результата в реальном времени, секвенирование РНК и различные методики биоинформатического анализа. Также приводится подробное описание выполненных методик оценки пролиферации и миграции мезенхимных клеток сердца, а также их способности к дифференцировке в условиях гипоксии.



Объективное и скрупулезное описание методологических подходов и примененных в диссертационной работе методик (в том числе методов статистического анализа экспериментальных данных) указывает на высокий уровень методологической подготовки автора.

### **Глава 3. Результаты и обсуждение**

Работа включает анализ экспрессии компонентов сигнального пути Notch в тканях постинфарктного миокарда и мезенхимных клетках в условиях экспериментально индуцированной гипоксии и в реальных клинических сценариях (при тетраде Фалло). Установлены изменения молекулярного профиля генной экспрессии при экспериментальном инфаркте миокарда и при индуцированной гипоксии *in vitro*, расшифрованы молекулярно-биологические и патофизиологические основы раннего ремоделирования с участием сигнальных путей Notch и BMP. Показан высокий пролиферативный и миграционный потенциал постинфарктных мезенхимных клеток сердца крыс вследствие гипоксической активации сигнального пути Notch. Важным является сделанное автором наблюдение о дозозависимой гиперэкспрессии транскрипционного фактора Runx2 при экзогенной активации сигнального пути Notch, а также о выраженной дисрегуляции Notch-пути в мезенхимных клетках сердца от пациентов с тетрадой Фалло. Получены данные о взаимодействии сигнальных путей Notch и BMP в контексте эндотелиально-мезенхимной дифференцировки и фиброза миокарда, а также о взаимном изменении молекулярного профиля при сокультивировании эндотелиальных клеток пупочной вены и мезенхимных клеток сердца человека. В совокупности полученные результаты следует признать научно значимыми и расширяющими современные представления о роли и механизмах участия сигнального пути Notch в изменении фенотипа мезенхимных стволовых клеток при гипоксии, ишемии и инфаркте миокарда. Особенно стоит выделить наблюдения, сделанные при сокультивировании эндотелиальных клеток и мезенхимных стволовых клеток, поскольку именно такое моделирование имеет высокую значимость для исследования нормальной и патологической физиологии. Отдельно нужно отметить изучение аспектов эндотелиально-мезенхимного перехода, который играет важную роль в эмбриогенезе и при развитии различных патологических состояний, в том числе ишемического генеза.

### **Заключение**

Подведены итоги исследования, сформулированы выводы, соответствующие цели и задачам работы. Четко сформулировано, что инфаркт миокарда и индуцированная гипоксия *in vitro* способствует активации сигнальных путей Notch и BMP2, в том числе транскрипционного фактора Runx2, и таким образом усиливает пролиферацию, миграцию и дифференцировку резидентных мезенхимных

стволовых клеток сердца в различных направлениях. Акцентируется внимание на том, что экзогенная гиперэкспрессия сигнального пути Notch в мезенхимных стволовых клетках человека и крысы приводит к изолированной активации Notch-пути, не влияя на экспрессию сигнального пути BMP2, усиливает их дифференцировку в кардиогенном направлении и способствует развитию эндотелиально-мезенхимного перехода.

Научные результаты работы докладывались на 13 международных и российских конференциях. По материалам исследования опубликовано 20 научных работ, включая 7 статей в журналах WoS/Scopus. Диссертация отличается оригинальностью и научной новизной, а ее результаты могут быть использованы в дальнейших исследованиях в области регенеративной медицины и для разработки новых, молекулярно ориентированных способов фармакотерапии методов лечения сердечно-сосудистых заболеваний.

#### **Замечания и предложения по работе**

1. В разделе обсуждения (стр. 93) хотелось бы более подробного рассмотрения молекулярных механизмов взаимодействия сигнальных путей Notch и BMP при гипоксии, учитывая клиническую релевантность данного типового патологического процесса.
2. В разделе 2.5.2, описывающем трансдукцию культур лентивирусными векторами BMP2 и NICD, следовало бы привести больше информации о конструкции векторов.
3. В разделе 2.4.9, описывающем сокультивирование эндотелиальных клеток пупочной вены и мезенхимных клеток сердца человека, название главы не полностью отражает содержимое. Было бы полезно более четко выделить ключевые эксперименты и их значение для исследования взаимодействия клеток.
4. В разделе 3.2.6, где обсуждается дозозависимая активация сигнального пути Notch, было бы интересно увидеть сравнение полученных данных с существующими литературными источниками, подчеркивающее уникальность результатов.
5. На рисунках 9 и 10 шрифт подписей графиков слишком мелкий, что затрудняет восприятие данных. Рекомендуются увеличить размер текста на графиках для большей читаемости.
6. В разделе 3.3.5 результаты взаимодействия сигнальных путей Notch и BMP в развитии эндотелиально-мезенхимного перехода недостаточно обсуждаются в контексте потенциальных терапевтических подходов.

Эти замечания не умаляют ценности работы, а подчеркивают ее научную значимость в контексте возможностей для дальнейшего развития научной тематики.

## Заключение

Диссертация Павла Михайловича Докшина является завершенной научной работой, содержащей оригинальные данные и важные для клеточной биологии выводы, вносящие вклад в изучение регенерации сердца и регуляции фенотипа резидентных мезенхимных клеток посредством сигнального пути Notch при различных болезнях сердца. Работа соответствует всем требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, установленным в пунктах 9-11, 13, 14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г. (в действующей редакции), а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.22. Клеточная биология.

Отзыв на диссертационную работу Павла Михайловича Докшина «Notch-зависимые механизмы функциональной регуляции мезенхимных клеток сердца при остром инфаркте и пороках развития» обсужден и одобрен на заседании Проблемной комиссии № 18 Проблемной комиссии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» от 13.11.2024 г.

Заведующий отделом  
экспериментальной медицины  
Федерального государственного  
бюджетного научного учреждения  
«Научно-исследовательский  
институт комплексных проблем  
сердечно-сосудистых заболеваний»,  
доктор медицинских наук

Кутихин Антон Геннадьевич

Подпись Кутихина А.Г. заверяю:

Ученый секретарь Федерального  
государственного бюджетного  
научного учреждения «Научно-  
исследовательский институт  
комплексных проблем сердечно-  
сосудистых заболеваний», кандидат  
медицинских наук



Казачек Яна Владимировна

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» (НИИ КПССЗ). Адрес: 650002, г. Кемерово, бульвар имени академика Л.С. Барбараша, стр. 6. Тел: +7(3842)643-308. Факс: +7(3842)643-410. e-mail: [reception@kemcardio.ru](mailto:reception@kemcardio.ru), сайт: [www.kemcardio.ru](http://www.kemcardio.ru)