

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

На диссертацию Л.Л. Алексеенко на тему
«Реакция стволовых клеток человека на тепловой стресс»,
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

1. Актуальность темы диссертации

Диссертационная работа Алексеенко Л.Л. относится к одному из наиболее интенсивно развивающихся направлений клеточной биологии. Она посвящена изучению свойств эмбриональных и мезенхимных стволовых клеток (СК), применение которых может в будущем стать средством лечения широкого круга заболеваний. К настоящему времени в доклинических исследованиях показана возможность применения СК для лечения последствий инсультов, инфарктов, нейродегенеративных заболеваний, повреждений и дефектов развития опорно-двигательного аппарата. Недостаток знаний и неопределенность ряда представлений об СК препятствует адекватной оценке полученных результатов и перспектив их использования в условиях клиники. Изучение реакций СК на внешние воздействия позволяет выявить многие, неизвестные ранее особенности природы этих клеток как в условиях их культивирования, так и в целостном организме. Примером исследований такого рода могут служить недавно опубликованные и вызвавшие острую дискуссию данные о репрограммировании соматических клеток животных под влиянием изменений кислотности среды (Nature, 2014. V. 505, PP. 641, 676). Независимо от итоговой оценки указанных экспериментов очевидно, что сумма накопленных знаний о стволовых клетках разных типов пока недостаточна, что позволяет признать актуальность рассматриваемой работы несомненной.

2. Цели и задачи исследования, пути их решения.

Цель диссертационной работы Алексеенко Л.Л. состояла в исследовании механизмов ответа эмбриональных СК человека, их дифференцированных потомков и СК зрелого организма на температурный стресс.

Объектами исследования служили линии эмбриональных СК человека (чЭСК), их дифференцированные производные (чЭСК–ДИФ), а также линии эндометриальных мезенхимных стволовых клеток (эмМСК) взрослого организма. В качестве дозируемого воздействия было использовано нагревание культур до 45⁰ С в течение 10 или 30 минут.

Основные задачи работы состояли в оценке жизнеспособности, пролиферативной активности и генетической стабильности клеток указанных линий, испытывавших тепловое воздействие.

Предстояло также сравнить распределение интактных и прогретых клеток всех изучаемых линий по фазам клеточного цикла и изучить экспрессию и локализацию основных белков теплового шока после мягкого и жесткого температурного воздействия.

Для решения поставленных задач диссертантке было необходимо применить широкий круг современных методов культивирования клеток, кариотипирования, иммуноцитохимического и цитофлуориметрического анализа, электрофореза, иммуноблоттинга и обратнотранскрипционной ПЦР. Владение столь широким арсеналом методических приемов свидетельствует о о высоком уровне профессиональной подготовки автора.

3. Характеристика результатов и анализ выводов

Для выполнения поставленных в исследовании задач автором прежде всего были подробно охарактеризованы те линии чЭСК, чЭСК-ДИФ и эМСК, которые послужили объектами дальнейших исследований. Было установлено, что клетки линии чЭСК С910 обладают типичной морфологией, способны размножаться в течение длительного времени, экспрессируют маркеры плюрипотентности Oct-4, Nanog, SSEA-4, Rex1, имеют высокую активность щелочной фосфатазы и могут дифференцироваться в клетки трех зародышевых листков. Аналогично были верифицированы характеристики чЭСК-ДИФ, отличие которых состояло в склонности к репликативному старению и сопряженному усилению активности бета-галактозидазы, а также эМСК линии 2304, в наибольшей мере сходные с МСК костного мозга человека.

Таким образом, принадлежность использованных в работе линий к разным категориям СК была подтверждена и документирована. Этот объемный фрагмент работы не нашел отражения в выводах, но придал весомость и значимость остальным результатам.

Проследивая судьбу клеток, переживших тепловой стресс, автор установила, что гипертермия вызывает апоптотическую гибель части эмбриональных стволовых клеток, тогда как в их дифференцированных производных и в эМСК активизируются процессы преждевременного старения. Эти результаты, обоснованные данными проточной цитофлуорометрии, микроскопических наблюдений и выявлением активности бета-галактозидазы, позволили автору сформулировать выводы 1 и 2.

Наблюдения за клетками, пережившими тепловой стресс, привели автора к заключению, согласно которому чЭСК после воздействия сохраняют экспрессию маркеров плюрипотентности, пролиферативный и дифференцировочный потенциал (вывод 5). Особенностью потомков эндометриальных СК, перенесших тепловой стресс, является,

активизации процесса репликативного старения при сохранении диплоидного кариотипа, фенотипических признаков, способности к дифференцировке (вывод 6).

При исследовании экспрессии и локализации белков теплового шока методами иммуноблоттинга и ОТ-ПЦР автором было обнаружено, что воздействие неодинаково влияет на экспрессию индуцибельной формы Hsp70: в чЭСК уровень экспрессии этого белка падает, а в эМСК дифференцированных производных он возрастает (вывод 3). В той же серии опытов автором установлено, что конститутивная форма Hsp70 (Hsc70) экспрессируется на мембране интактных чЭСК, но отсутствует на поверхности их дифференцированных производных и эндометриальных МСК. Под влиянием теплового воздействия уровень экспрессии этого белка в изученных клетках не изменялся (вывод 4).

Все выводы четко сформулированы и представляются достаточно обоснованными.

4. Научная новизна и практическая значимость работы

В работе получен ряд новых научных данных. Впервые показано, что эмбриональные и взрослые стволовые клетки человека по-разному реагируют на сублетальное тепловое воздействие, что гипотермия вызывает апоптотическую гибель ЭСК, но не индуцирует апоптоз в их дифференцированных производных и в МСК взрослого организма. Также впервые показано, что сублетальный тепловой стресс вызывает у дифференцированных производных чЭСК и взрослых стволовых клеток стресс-индуцированное преждевременное старение (SIPS) и что стволовые клетки человека, как эмбриональные, так и взрослые мезенхимные, пережив сублетальный тепловой стресс, сохраняют свойства родительских клеток.

В работе впервые установлено, что в чЭСК конститутивная форма белка теплового шока Hsc70 экспрессируется на поверхности клеточной мембраны. Тепловой стресс по-разному влияет на экспрессию индуцибельной изоформы Hsp70 в изученных клетках. При сублетальном воздействии уровень Hsp70 чЭСК снижается, а в их дифференцированных производных и в эМСК - возрастает. Сублетальный тепловой стресс вызывает апоптотическую гибель определенной части популяции чЭСК, остановку пролиферации дифференцированных чЭСК и эМСК, блокируя их в G0-G1 и G2-M фазах клеточного цикла, что приводило к стресс - индуцированному преждевременному старению. Потомки клеток всех изученных линий, пережившие сублетальное тепловое воздействие, сохраняли свойства исходных родительских клеток и не проявляли признаков генетической нестабильности.

По материалам исследования опубликовано пять статей, две из которых помещены в зарубежных изданиях, а также в пяти тезисах докладов в материалах трех российских и двух

международных конференций. Автореферат отражает содержание диссертации с достаточной полнотой.

5. Структура диссертации и ее оформление

Материалы диссертации изложены на 133 страницах машинописного текста, и иллюстрированы 27 рисунками. Диссертация построена по традиционному плану, состоит из введения, обзора литературы (Глава 1), описания материалов и методов (Глава 2), описания полученных результатов (Глава 3), обсуждения (Глава 4), заключения (Глава 5), выводов и списка литературы, который включает около 450 источников, подавляющее большинство которых относится к иноязычным публикациям.

Обзор литературы по объему составляет около 30% рукописи (40 страниц). В нем рассмотрены современные концепции и сведения об эмбриональных СК (чЭСК) и мезенхимальных (МСК), выделенных из тканей взрослого организма. Второй раздел обзора посвящен реакциям клеток на тепловое воздействие. В нем рассмотрены формы клеточной гибели, сдвиги в структуре клеточных мембран, цитоскелета и органелл, а также участие в этих реакциях семейства белков теплового шока. Содержание обзора, его широта и стиль изложения свидетельствует о высокой научной эрудиции автора.

Общее впечатление, сложившееся на основе ознакомления с рукописью: диссертантка выполнила трудоемкое фундаментальное исследование, в котором использованы современные методы культивирования клеток, молекулярно-биологического, иммунохимического, морфологического, и цитогенетического анализа, получены оригинальные экспериментальные данные, дополняющие представления о природе и свойствах стволовых клеток.

6. Критические замечания и вопросы к дискуссии

Единственное замечание, касающееся оформления рукописи, состоит в том, что ссылки на цитируемые источники расположены, как принято, в алфавитном порядке, но нумерация их отсутствует. Поэтому количество цитированных работ можно оценить лишь приблизительно.

Вопрос для дискуссии. Роль фидерного слоя в поддержании жизнеспособности и размножения интактных культивируемых клеток разных типов и категорий общеизвестна. Эмбриональные стволовые клетки стандартно выращивают в присутствии фидерных клеток разной степени чужеродности. В обзоре литературы (стр. 33) отмечена способность фидерных клеток, в том числе и мезенхимальных, выделять в среду фрагменты цитоплазмы (внеклеточные везикулы, экзосомы) и посредством их влиять на сокультивируемые клетки. В теоретическом и в практическом отношении важно представлять себе, в какой мере «общение» между

фидерными и исследуемыми клетками, подвергнутыми определенному воздействию, может влиять их выживаемость, другие важные характеристики и в конечном счете - на результаты исследований, в которых сокультивирование является стандартным приемом.

7. Заключение.

Диссертационное исследование Алексеенко Л.Л. «Реакция стволовых клеток человека на тепловой стресс» является завершенной квалификационной научно-исследовательской работой, в которой описаны неизвестные ранее закономерности реакций стволовых клеток человека на тепловое воздействие, получены новые данные фундаментального характера и сформулированы предложения, касающиеся возможного практического применения полученных результатов.

По своей актуальности, объему проведенных исследований, высокому методическому уровню, и новизне полученных результатов работа соответствует требованиям ВАК, содержащимся в "Положении о порядке присуждения ученых степеней", утвержденном постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология.

Официальный оппонент



Климович Владимир Борисович

доктор медицинских наук, профессор,

руководитель лаборатории гибридной технологии

Федерального государственного бюджетного учреждения

«Российский научный центр радиологии и хирургических технологий»

Министерства здравоохранения Российской Федерации,

197758 Санкт-Петербург, Песочный п, Ленинградская, 70.

Тел. (812) 596-84-62, mcrht@mail.ru

12.05. 2014

ПОДПИСЬ РУКИ <i>В. Б. Климовича</i>
Канцелярия "Российского научного центра радиологии и хирургических технологий" Министерства здравоохранения Российской Федерации Удостоверяет
Зав. канцелярией <i>[подпись]</i>

