

Отзыв официального оппонента на диссертационную работу

Алексеевко Ларисы Леонидовны

« Реакция стволовых клеток человека на тепловой стресс», представленную к защите на соискание учёной степени кандидата биологических наук (специальность 03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология)

Исследование биологических свойств стволовых клеток в наши дни является одним из самых актуальных тем современной клеточной биологии. В этом направлении работают ведущие лаборатории всего мира, так как именно понимание биологии стволовых клеток чрезвычайно важно как для фундаментальных исследований, так и для прикладных. Стволовые клетки являются большой надеждой клиницистов в отношении возможностей регенерационной терапии широкого спектра заболеваний.

Эмбриональные стволовые клетки являются плюрипотентными и обеспечивают развитие всего организма. Стволовые клетки взрослого организма, так называемые резидентные стволовые клетки, несут ответственность за развитие новых тканей, восстановление и регенерацию поврежденных тканей и органов. Оба типа клеток самообновляются *in vitro* и могут размножаться в культуре в течение длительного времени. И эмбриональные, и взрослые стволовые клетки должны иметь механизмы, обеспечивающие их генетическую стабильность. Понимание этих механизмов важно, так как, в конечном счете, неспособность клетки противостоять стрессу, в особенности генотоксическому, лежит в основе возникновения многих заболеваний человека. В этой связи диссертационная работа Ларисы Леонидовны Алексеевко, посвященная изучению реакции стволовых клеток человека на тепловой стресс, представляется чрезвычайно интересной и актуальной.

Реакция культивируемых стволовых клеток человека на стресс активно изучается. За последние несколько лет опубликовано много работ, в которых показано, что предварительная обработка трансплантируемых стволовых клеток сублетальными дозами различных факторов стресса увеличивает их толерантность и регенеративные свойства. Это относительно новое направление в биологии стволовых клеток. Вопрос об увеличении и расширении дифференцировочного потенциала стволовых клеток очень важен и с точки зрения потенциального применения стволовых клеток в терапии заболеваний, и с точки зрения фундаментальных знаний.

В диссертационной работе Л. Л. Алексеевко впервые были получены данные, которые являются приоритетными для клеточной биологии, в частности для биологии плюрипотентных стволовых клеток. Автором впервые были установлены следующие важные закономерности воздействия теплового шока на эмбриональные стволовые клетки человека:

-впервые показано, что эмбриональные и взрослые стволовые клетки человека по-разному реагируют на сублетальное тепловое воздействие;

-впервые показано, что ТШ вызывает апоптотическую гибель ЭСК, но не индуцирует апоптоз в их дифференцированных производных и МСК.

-впервые показано, что сублетальный тепловой шок вызывает у дифференцированных производных чЭСК и взрослых стволовых клеток стресс-индуцированное преждевременное старение (SIPS);

-впервые показано, что эмбриональные и взрослые мезенхимные стволовые клетки человека, пережившие сублетальный тепловой шок, сохраняют свойства родительских клеток.

Диссертация построена по традиционному плану, изложена на 134 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы; проиллюстрирована 27 рисунками. В обзоре литературы приведены обширные данные об известных на сегодняшний день механизмах регуляции плюрипотентности, самовозобновления и дифференцировки стволовых клеток. Автором подробно рассмотрены молекулярные и клеточные механизмы ответа клеток на гипертермию.

В своей диссертационной работе Л.Л. Алексеенко использовала широкий спектр современных методов: культивирование эмбриональных стволовых клеток человека, а также мезенхимных стволовых клеток эндометрия, иммунофенотипический анализ с использованием проточной цитометрии, анализ клеточного цикла, методами проточной цитометрии, анализ апоптоза, кариотипирование, иммуноцитохимические методики, электрофорез и иммуноблоттинг, анализ генной экспрессии с помощью ОТ-ПЦР. Все использованные в работе методы адекватны поставленным задачам.

В разделе «Результаты» и «Обсуждение» подробно и логично изложены результаты всех проведённых экспериментов и проведён детальный анализ полученных результатов в контексте имеющихся данных литературы. Полученные в работе результаты отражены в графиках и на фотографиях. Обращает на себя внимание прекрасное качество иллюстративного материала – фотографии и рисунки ясные и чёткие, и хорошо иллюстрируют экспериментальные результаты и выводы автора. Постановка всех экспериментов очень логично и чётко аргументирована в тексте работы, и полученные результаты экспериментов также изложены ясно и чётко, что в совокупности производит очень хорошее впечатление на читателя и однозначно подводит его к выводам, сделанным в итоге проведённой работы. Выводы диссертации базируются на большом экспериментальном материале и имеют высокий уровень доказательности. Содержание диссертационной работы отражено в автореферате в полном объёме, представлен иллюстративный материал высокого качества, убедительно доказывающий корректность сделанных выводов.

К наиболее важным результатам и выводам следует отнести следующие. В представленной работе показано, что эмбриональные стволовые клетки человека (чЭСК) и мезенхимные стволовые клетки (МСК) взрослого организма отвечают на повреждающее воздействие гипертермии по-разному. При сублетальном температурном воздействии чЭСК подвергаются апоптозу, а МСК эндометрия (эМСК) – преждевременному старению. Полученные данные свидетельствуют о том, что механизмы поддержания целостности генома принципиально различаются в эмбриональных клетках и клетках взрослого организма. Это означает, что в процессе развития и дифференцировки клетки должны

проходить стадию переключения с одного типа защиты генома на другой. Вопрос о времени и условиях этого переключения остаётся открытым в современной науке.

Другой важный вывод диссертационной работы Л. Л. Алексеенко состоит в том, что чЭСК и эМСК, пережившие сублетальное тепловое воздействие, сохраняют свойства исходных клеток. Выжившие чЭСК самообновляются, сохраняют плюрипотентность и могут дифференцироваться в клетки трех зародышевых листков. Потомки эндометриальных МСК не меняют свою морфологию, подвержены репликативному старению, сохраняют диплоидный кариотип и экспрессию поверхностных маркеров мезенхимных клеток. Эти факты, полученные в диссертационной работе, опять таки свидетельствуют о том, что в развитии должен присутствовать этап, когда происходит переключение с «эмбрионального» типа регуляции на «взрослый», и это переключение уже является необратимым в физиологических условиях. Понимание механизмов такого переключения особенно важно в связи с открытием явления репрограммирования. При репрограммировании, открытом лауреатом Нобелевской премии Ш. Яманакой в 2006 г., происходит полное, как полагают, переключение регуляции генома со взрослого типа на эмбриональный. Несмотря на огромное количество работ в области репрограммирования, мы до сих пор не знаем, что именно – какие группы генов или областей ДНК включает и включает «коктейль Яманаки».

Наконец, в настоящей работе выявлено, что мягкий тепловой шок (ТШ) (45 оС, 10 мин), увеличивает уровень Hsp70 как в чЭСК, так и в эМСК. В условиях жесткого ТШ (45 оС, 30 мин) уровень Hsp70 в эмбриональных стволовых клетках уменьшается, в то время как в эМСК при этих условиях уровень Hsp70 остается высоким, по крайней мере, в течение 72 ч. Сам автор задаётся вопросом о том, является ли различие в накоплении Hsp70 и реакции эмбриональных и взрослых стволовых клеток на сублетальный ТШ (апоптоз и SIPS, соответственно) причинно связанными между собой событиями, не известно. Для ответа на этот вопрос необходимы дальнейшие исследования и таким образом проведённая автором работа и полученные результаты открывают новые перспективы для будущих важных исследований.

К замечаниям по диссертации можно отнести незначительные стилистические погрешности и англицизмы. Остался неясным смысл фразы из раздела «Обсуждение» «Они (клетки) были способны дифференцироваться в адипоциты, остеобласты (производные мезодермы) и трансдифференцироваться в нейроноподобные клетки (эктодермальное направление)». Почему для адипоцитов и остеобластов употреблён термин «дифференцироваться», а для нейроноподобных клеток – «трансдифференцироваться». Осталось непонятным, что означают «неоптимальные условия культивирования» в фразе «*In vitro* дифференцировочный потенциал может быть проверен при переводе ЭСК в неоптимальные условий культивирования».

Ещё один вопрос касается соотнесения автором повышенной экспрессии гена каспазы 3 с индукцией апоптоза в клетках. В классическом понимании механизмов запуска апоптоза синтез *de novo* транскрипта эффекторной каспазы, как правило, не требуется - и транскрипты и про-белок каспазы предсуществуют в достаточном количестве в клетке для того, чтобы клетка могла быстро вступить в апоптоз. При запуске же апоптоза происходит дробление про-белка соответствующей эффекторной каспазы и активация фермента путём

сборки активных субъединиц в тетраду. Таким образом, классически для подтверждения участия каспазы-3 в процессе апоптоза используют скорее метод иммуноблоттинга, показывающий наличие активированной формы этой каспазы. Демонстрация же накопления транскрипта каспазы 3 представляется не совсем адекватной. Кроме того, среди приведённых в разделе «Материалы и методы» праймеров, последовательности праймеров к каспазе 3 отсутствуют.

Высказанные замечания не снижают высокий научный уровень диссертационной работы.

По теме диссертации опубликовано 10 печатных работ, в том числе 5 статей и 5 тезисов. Материалы диссертации были представлены на III конференции общества клеточной биологии (Санкт-Петербург, 2012), IV Съезде биофизиков России. Симпозиум III «Физика – медицине и экологии» (Нижний Новгород, 2012), на 3-й международной конференции «Stem Cells and Cancer: Proliferation, Differentiation and Apoptosis» (New-Delhi, India, 2012), 38-м конгрессе FEBS (Saint Petersburg, Russia, 2013), Всероссийском симпозиуме «Биология клетки в культуре» (Санкт-Петербург, 2013) и на научных семинарах Отдела внутриклеточной сигнализации и транспорта Института цитологии РАН.

В целом диссертация Л. С. Алексеенко, выполненная на высоком научном и методическом уровне, заслуживает высокой оценки; в ходе её выполнения получены новые данные по актуальной проблеме. Считаю, что диссертационная работа Ларисы Леонидовны Алексеенко «Реакция стволовых клеток человека на тепловой стресс», выполненная под руководством академика РАН Николая Николаевича Никольского, является законченной квалификационной работой, содержит новые данные о реакции эмбриональных стволовых клеток человека на тепловой шок, имеет существенное значение для клеточной и молекулярной биологии и биологии развития. Считаю, что диссертация соответствует требованиям «Положения о порядке присуждения учёных степеней» ВАК, предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени кандидата биологических наук, а Лариса Леонидовна Алексеенко, безусловно, заслуживает присуждения ей учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология

зав. НИИ Молекулярной кардиологии
Федерального медицинского исследовательского
центра им. В.А. Алмазова
доц. Каф. эмбриологии СПбГУ
К.б.н.

11.08.14

Малашичева



А.Б. Малашичева

Малашичева А.Б.

Заверяю

Спец. во КР

ММЗ

Данные об авторе отзыва:

Малашичева Анна Борисовна, заведующая лабораторией Молекулярной кардиологии
ФГБУ «Федерального медицинского исследовательского центра им. В. А. Алмазова»
Минздрава России, 197341, Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, д.2, тел. (812)307 37 77,
электронная почта amalashicheva@gmail.com