

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ФГБУ «НИИ онкологии
им. Н.Н. Петрова» Минздрава России
доктор медицинских наук, профессор
_____ А.М. Беляев



«6» июня 2014 г.

О Т З Ы В

ведущей организации – Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт онкологии им. Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации на диссертационную работу Алексеенко Ларисы Леонидовны на тему: «Реакция стволовых клеток человека на тепловой стресс», представленную к защите в совет по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 002.230.01 при ФГБУ «Институт цитологии» РАН на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология.

Актуальность темы диссертации

Реакция стволовых клеток (СК) человека, как эмбриональных, так и стволовых клеток взрослого человека на стресс интенсивно изучается в последние, что связано с развитием биотехнологических подходов к терапии различных заболеваний. В работе Л.Л. Алексеенко основное внимание уделено исследованию ответа стволовых клеток человека различного происхождения и состояния – эмбриональных (чЭСК), их дифференцированных производных (чЭСК-ДИФ) и эндометриальных мезенхимных стволовых клеток (ЭМСК), на температурный стресс – один из существенных и весьма переменных стрессовых факторов окружающей среды, что свидетельствует об актуальности выбранной темы диссертационной работы. В задачи работы входил анализ стволовых клеток на различную степень прогрева, при этом оценивались жизнеспособность клеток и их пролиферативная активность; распределение клеток по фазам клеточного цикла, изучение экспрессии и локализации ряда белков теплового шока в трех видах СК после воздействия теплового шока разной интенсивности, а также изучение генетической стабильности и экспрессии маркеров пролиферации СК после воздействия сублетального теплового шока.

Научная новизна работы.

Диссертационная работа Л.Л.Алексеевко отвечает критериям научной новизны. Важным приоритетным наблюдением автора было выявление различной реакции стволовых клеток эмбриона и взрослого человека на сублетальный тепловой шок. Также впервые было показано, что чЭСК при прогреве подвергаются апоптозу, тогда как в чЭСК-ДИФ и в эМСК этот фактор апоптоз не индуцирует. Кроме того, было впервые показано, что сублетальный тепловой шок вызывает преждевременное старение у этих типов стволовых клеток.

Диссертация построена по традиционному плану и включает введение, в котором рассмотрены актуальность проблемы, цели и задачи исследования, научная новизна работы, ее теоретическое и практическое значение, сформулированы основные положения, выносимые на защиту, обзор литературы, главу, посвященную материалам и методам, описания результатов собственных исследований их обсуждения, выводы и заключение. Список цитированной литературы достаточно обширен (общее число ссылок не указано), причем только 11 цитированных работ опубликовано на русском языке. Общий объем диссертации 133 страницы, включающих 27 рисунков и 3 таблицы.

Обзор литературы выдержан в монографическом стиле, написан хорошо и подробно, содержит удачно составленные схемы и таблицы, но его объем (42 стр.) явно завышен, составляя почти треть всей диссертации. Обзор можно было бы без ущерба для содержания сократить наполовину за счет сведений, прямо не относящихся к теме диссертации. Тем более, что разделы обзора, касающиеся эффектов теплового шока на СК, производит самое благоприятное впечатление.

Глава «Материалы и методы» (12 стр.) весьма убедительно свидетельствует о владении диссертанткой многими современными молекулярно-биологическими, цитологическими и морфологическими методами, и соответственно, о ее высокой квалификации как экспериментатора.

Глава, содержащая изложение основных результатов диссертационного исследования, занимает 22 страницы, прекрасно иллюстрирована демонстративными цветными рисунками высокого качества. Глава состоит из 4 разделов. В первом из них приводится подробная характеристика трех клеточных линий СК, использованных в работе. Второй раздел посвящен описанию результатов изучения воздействия теплового шока разной интенсивности на чЭСК и чЭСК-ДИФ. Установлено, что 10-минутный тепловой шок увеличивает экспрессию белка Hsp70 в этих клетках, тогда как более длительное воздействие (30 мин) угнетает экспрессию этого белка в чЭСК, но не в чЭСК-ДИФ, в которых такое воздействие сопровождается дальнейшим увеличением экспрессии белка теплового шока. Достаточно убедительно автор демонстрирует компартментализацию эффектов теплового шока и различия в способности нагревания индуцировать апоптоз в эмбриональных и дифференцированных стволовых клетках. Важным результатом является обнаружение ускоренного стресс-индуцируемого клеточного старения в дифференцированных чЭСК под влиянием нагрева, тогда как недифференцированные клетки такой реакцией на нагрев не отвечают.

В третьем разделе главы «Результаты» автор приводит данные о свойствах плюрипотентных эмбриональных и дифференцированных СК человека после воздействия сублетального теплового шока. Завершают главу описания результатов изучения воздействия теплового шока на эндометриальные мезенхимные стволовые клетки взрослого человека. В частности, выявлено, что нагревание не индуцирует в них апоптоз, но развивается стресс-индуцируемое преждевременное клеточное старение.

Глава, содержащая обсуждение полученных данных, привлекает хорошим академическим стилем и логикой, позволяющей сопоставить имеющиеся сведения с собственными наблюдениями. Следует отметить также корректность интерпретаций, свидетельствующих о научной зрелости диссертанта. Выводы, а всего их шесть, сформулированы кратко, но очень четко.

Однако в порядке дискуссии хотелось бы получить разъяснения диссертанта по следующим вопросам:

1. В выводе 2 диссертации утверждается, что сублетальный тепловой шок вызывает преждевременное старение (SIPS) дифференцированных производных чЭСК и мезенхимных стволовых клеток эндометрия (эмСК). Однако, данные, представленные на рис. 18Б (стр. 75 диссертации) и рис. 6Б (стр. 15 автореферата), свидетельствуют скорее не о блоке клеточного цикла, а об убыли числа клеток из фазы G₀/G₁.
2. Можно ли считать блоком G₂/M увеличение доли клеток в этой фазе на 7% - 12%?
3. Как объяснить практически отсутствие изменений доли клеток, находящихся в стадии S репликации ДНК, которая варьирует в пределах 1-2%.
4. Правомерно ли делать вывод о клеточном старении по накоплению числа SA-B-Gal -позитивных клеток?
5. Не противоречит ли автор сама себе, показав, что прикрепившиеся к культуральному пластику клетки имели фибробластоподобную структуру, возобновляли пролиферацию и продолжали делиться, как и непрогретые клетки. С увеличением числа удвоений деление клеток замедлялось, появлялись уплощённые клетки увеличенного размера, экспрессирующие β-галактозидазу, ассоциированную со старением. Следовательно, те изменения, которые наблюдались через 72 часа после прогрева, полностью обратимы и можно ли это назвать старением?

Следует также отметить, что диссертация не свободна от опечаток, неудачных выражений, научного сленга и англицизмов. Не по стандарту оформлен список литературы. Эти замечания ни в коей мере не снижают благоприятного впечатления от работы, заслуживающей высокой оценки.

Значимость полученных результатов для науки и практики

Результаты, полученные в ходе данного исследования, представляют определенный интерес не только в области экспериментальной биологии, но

и могут найти применение в практике при разработке клеточных методов терапии различных заболеваний у человека.

Основные результаты диссертации нашли отражение в 10 научных публикациях, из них в рекомендуемых ВАКом журналах – 5 статей.

Заключение

Диссертационная работа Ларисы Леонидовны Алексеенко на тему: ««Реакция стволовых клеток человека на тепловой стресс», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология, является законченным самостоятельным научно-квалификационным исследованием, полностью соответствует требованиям «Положения ВАК РФ» от 24.09.2013 г. предъявляемым к кандидатским диссертациям по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология, а её автор, безусловно, заслуживает искомой учёной степени.

Диссертационная работа и отзыв обсуждены и одобрены на заседании Отдела канцерогенеза и онкогеронтологии НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова Минздрава РФ (протокол № 3 от 26 мая 2014 г.).

Руководитель отдела канцерогенеза и
онкогеронтологии НИИ онкологии им.
Н.Н.Петрова Минздрава РФ
член –корр. РАН, доктор мед. наук, профессор

В.Н. Анисимов

