

ОТЗЫВ

на диссертацию Домниной Алисы Павловны «ЭНДОМЕТРИАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ: ПОЛУЧЕНИЕ, ХАРАКТЕРИСТИКА И ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ СТИМУЛЯЦИИ РАЗВИТИЯ ЭНДОМЕТРИЯ КРЫС», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04. (Клеточная биология, цитология, гистология).

Актуальность темы исследования. Получение, изучение и практическое применение стволовых клеток – генеральное направление современной биологии и регенерационной медицины. Практически наиболее продвинутыми в этой области являются мультипотентные мезенхимные стволовые клетки (МСК) костного мозга. Однако, учитывая определенные сложности их получения, связанные с необходимостью хирургического вмешательства, подбором соответствующих доноров, сохраняет безусловную актуальность поиска других источников соматических стволовых клеток (жировая ткань, пуповинная кровь плода, эмбриональные ткани). Естественным, нетравматичным и эффективным является способ получения МСК из фрагментов эндометриоидной ткани, находящихся в менструальной крови женщин репродуктивного возраста. Разработке такого метода и анализу свойств МСК, полученных таким способом, и посвящена рецензируемая работа А.П.Домниной. Актуальной данной работы не вызывает сомнения.

Научная новизна полученных результатов В работе получены и исследованы три линии МСК из фрагментов эндометрия менструальной крови; впервые предложена и апробирована модель для изучения стимулирующего эффекта полученных МСК на развитие децидуальной реакции в условиях их трансплантации в полость матки псевдобеременных крыс, иммунологическими способами доказана мезенхимная природа МСК, изучены пролиферативные свойства, осуществлена их направленная трансдифференцировка в клетки жировой (адипоциты) и костной (остеобласты) тканей

Практическая значимость. Простота получения, стабильность и высокая пролиферативная активность позволяют рассматривать МСК эндометрия (эМСК) в качестве удобных субстратов для различных вариантов клеточной терапии, в том числе для лечения бесплодия в программах ВРТ, связанных с неполноценностью эндометрия. эМСК могут найти применение в качестве модельных систем в вирусологии и фармакологии.

Структура диссертации. Диссертация А.П.Домниной написана по традиционному плану, включает «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и

методы», «Результаты», «Обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Список литературы», изложена на 98 страницах. Иллюстративный материал содержит 21 рисунок и 3 таблицы.

Во **Введении** кратко обосновывается очевидная актуальность темы, рассмотрены существующие представления о мезенхимных стволовых клетках, способах их получения, свойствах, формулируются цель и задачи исследования; кратко рассмотрены новизна и практическая значимость полученных результатов; отражены личный вклад автора и апробация работы, приведены положения, выносимые на защиту. Считаю, **неудачными выражения:** «пуповинного канатика» стр.5 (вместо «пупочный канатик»), «показалось ? интересным ». «децидуальная оболочка» (вместо «децидуальная ткань»), Душена (вместо Дюшенна) стр.6, не ясно, что имеется в виду под «*более интенсивным* (в сравнении с чем?) развитием децидуальной ткани (стр.8)

Обзор литературы изложен на 18 стр. содержит современную информацию об истории изучения МСК; их основные цитологические, иммуногистохимические и ростовые характеристики, в том числе способность к дифференцировке в различные типы клеток, рассмотрены данные опытов с эМСК на экспериментальных моделях. Знакомство с обзором свидетельствует о хорошем знании соискателем существа проблемы, умении не только компилировать, но и критически оценивать литературные данные. Вместе с тем, обзор не свободен от неточностей, неудачных выражений и грамматических опечаток. В частности, по мнению рецензента, *не точно приведена* существующая классификация стволовых клеток (стр. 12), которые изначально подразделяются на эмбриональные (клетки ВКМ) и соматические (все остальные) (см. Закиян и др. «Эпигенетика», 2012). Неудачные выражения: проточная цитофлуориметрия *на живых клетках* (стр.16), «опубликованы первые исследования в этом направлении *—без ссылок.*» (стр.20), «трансплантация стволовых клеток крысам с экспериментально вызванным инсультом *улучшало поведение* животных (стр.21) *интратекально* (это куда?) (стр.22), «обнаружение в эндометрии человека стволовых клеток *закрыло брешь*» (стр.22) «бластоцисты проникают из полости матки *через маточный эпителий в эндометрий* антимезометральной части матки» (стр.23), плоидность БДК «*до 20* и более единиц» стр.23 (*реально до 1000n*), «...*около 8 %* супружеских пар в течение репродуктивного периода (в действительности 15-18%)» (стр.25). Непонятно так же, почему обзор завершается (2 стр.) кратким изложением *результатов настоящего исследования.*

Глава 2 (Материалы и методы) занимает 11 страниц. Работа выполнена на образцах менструальной крови женщин, проходивших по программе ЭКО. Подробно рассмотрены техника получения первичных образцов десквамированного эндометрия,

получения первичных и перевиваемых клеточных культур, методов изучения поверхностных мембранных антигенов, пролиферативной активности, индукции дифференцировки в адипоциты и остеобласты, цитогенетического анализа кариотипа и репликативного старения. В целом все использованные соискателем методы вполне современные, стандартные, выполнены аккуратно и тщательно, свидетельствуют о зрелости соискателя, как экспериментатора, специалиста по клеточным культурам. Принципиальных замечаний у рецензента нет. Однако, хотел бы обратить внимание автора диссертации на следующие неточности:

Неясно какого возраста были женщина (материал и методы – 30 40 лет) в главе результаты – 24-38 лет (стр.40), да, вообще, их было всего 3 человека, о чем сразу можно было сообщить в главе Материал и Методы, указав абсолютный возраст каждой Стр.29. *«Конфлюэнтность 80% - это хорошо или плохо?»* (Стр.31); *«дифференцировочные факторы»* (м/быть лучше - индукторы или факторы дифференцировки) (стр.32);

- Глава «Результаты»** изложена на 21 страницах и включает подробное описание всей экспериментальной части работы: от получения первичных культур, клонирования ЭМСК, изучения их пролиферативной активности, кариотипа, иммунноцитохимических свойств до индукции псевдобеременности у крыс. Читается с интересом. Смущает, однако, полное отсутствие рубрикации в данной главе, что при наличии большого числа разноплановых экспериментов, существенно затрудняет оценку полученных данных. Следовало бы так же обратить внимание соискателя на ряд неточностей и неудачных выражений: *«дифференцировочный потенциал»* (стр.40) *«начинают пролиферировать»* – м/быть делиться (стр.41); *слишком малое увеличение* микрофотографий на рис.2 и .3; Слишком поверхностно представлен цитогенетический анализ, неудачное выражение *«структура кариотипа, типична для клеток человека в норме»* (стр.48), а так же рис.7 *«конъюгация гомологов хромосомы 22. Стрелкой указана изохромосома 22»*, так что же это было эктопическая конъюгация или изохромосома 22 » (стр.48). Рецензенту осталось неясным, что такое *«эффективность клонирования»* табл.2 (стр.49), рис.8 (стр.50); *сколько животных было в каждом эксперименте с ЭМСК человека и ККМ крысы и из какого числа образцов рассчитывали достоверность результатов; «срезы децидуа, в которые трансплантировали ЭМСК человека»* (стр.60) Просьба к соискателю объяснить почему *«псевдобеременность крыс является эффективной моделью для оценки влияния ЭМСК на функциональное состояние эндометрия»*. (стр.60)

Обсуждение изложено на 16 страницах. Последовательно и логично излагаются предпосылки к проведению данного исследования, как нового подхода в поисках

альтернативного пути получения стволовых клеток. Сравниваются пролиферативные, ростовые и другие свойства эМСК (плюрипотентность, устойчивость к длительному культивированию, сохранение маркеров плюрипотентности, отсутствие трансформации в клетки опухоли) с таковыми других типов СК, МСК костного мозга. Полученные результаты убедительно доказывают перспективность эМСК для целей регенеративной медицины..Неудачные выражения : Эндометрий человека, *состоящий из эндометриальных желез*,(стр.62); плюрипотентности Oct-4 не была выявлена ни иммунофлюоресценцией, ни *ПЦР ?*). (стр.64) .

Заключение В результате выполнения диссертационной работы А.П.Домниной разработан собственный неинвазивный и легко доступный способ получения стволовых клеток из десквамированного маточного эндометрия . Высокая пролиферативная активность, способность к длительному и стабильному культивированию, мультипотентность и отсутствие иммортализации при длительном культивировании делают десквамированный маточный эндометрий весьма перспективным источником стволовых клеток для клеточной терапии.

Научная новизна полученных результатов, их большая научная и практическая значимость очевидны. Проведенные исследования позволили существенно расширить существующие представления о новых альтернативных путях получения стволовых клеток. Оценивая результаты работы в целом, следует отметить высокий уровень дизайна эксперимента, актуальность и практическую ценность выполненной работы.

Диссертация Домниной А.П.. является законченной научно-квалификационной работой, представляющей несомненный теоретический и практический интерес, в которой решена научная задача, имеющая существенное значение для понимания природы стволовых клеток и новых возможностях их применения в медицине, в частности, для лечения бесплодия . Все данные получены автором впервые. Экспериментальная часть и обсуждение логичны и убедительны, результаты хорошо иллюстрированы, их достоверность не вызывает сомнения. Все положения диссертации , вынесенные на защиту выполнены полностью, они неоднократно докладывались на научных конференциях, хорошо известны специалистам и представлены в 8 публикациях (7 по списку ВАК) и одной патентной заявкой.. Выводы работы логичны и хорошо аргументированы. Содержание работы полностью отражено в автореферате.

Диссертационная работа Домниной Алисы Павловны «ЭНДОМЕТРИАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ: ПОЛУЧЕНИЕ, ХАРАКТЕРИСТИКА И ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ СТИМУЛЯЦИИ РАЗВИТИЯ ЭНДОМЕТРИЯ КРЫС », полностью соответствует требованиям,

предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук в п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» Высшей Аттестационной Комиссии Министерства образования и науки Российской Федерации, утвержденных Постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 года, Домнина А.П. заслуживает присуждения ей искомой ученой степени по специальности 03.03.04. (клеточная биология, цитология, гистология).

Зав. лабораторией пренатальной диагностики

Член –корр. РАН, профессор, д.м.н.

В.С.Баранов

Подпись В.С.Баранова заверяю

Ученый секретарь

10.06.14

И.Ю. Коган

д.м.н. И.Ю.Коган



Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии им. Д. О. Отта» Северо-Западного отделения Российской академии медицинских наук

199034, г.Санкт-Петербург, Менделеевская линия, д.3, E-mail: iagmail@ott.ru,