

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

На диссертацию А.П. Домниной на тему:

«Эндометриальные стволовые клетки: получение, характеристика и применение для стимуляции развития эндометрия крыс»,
представленную на соискание ученой степени кандидата
биологических наук по специальности 03.03.04 – Клеточная биология,
цитология, гистология

Актуальность темы исследования

Стволовые клетки взрослого организма в последние десятилетия являются предметом интенсивных исследований. Повышенное внимание к изучению этих клеток связано с перспективами их клинического применения. Несмотря на то, что накоплен некоторый мировой опыт клинического использования стволовых клеток, многие вопросы, касающиеся их происхождения, свойств и механизмов реализации эффектов, а также рисков, связанных с клеточной терапией, требуют изучения. В последнее десятилетие стало очевидным, что костный мозг является не лучшим источником стромальных стволовых клеток, и предстоит поиск альтернативных тканей, содержащих материал, пригодный для клеточной терапии. Критериями для выбора источника ткани становятся доступность материала, минимальная травматичность процедуры получения для донора клеточного материала, и, наконец, свойства выделяемых клеток. Рецензируемая работа Домниной А.П., посвященная выделению мезенхимных стволовых клеток (МСК) из десквамированного эндометрия, содержащегося в менструальной крови, находится в русле обозначенной проблематики. Безусловное преимущество этого источника клеток состоит в доступности материала. Немаловажным обстоятельством является также то, что выделение фракции МСК из менструальной крови не требует ферментативной обработки, что существенно для сохранения жизнеспособности эксплантируемых клеток и для оценки возможности их дальнейшего клинического применения. Наконец, МСК, выделенные из эндометрия (эМСК), представляются перспективным источником материала для клеточной терапии заболеваний, связанных с

несостоятельностью эндометрия, в том числе и таких, которые приводят к невынашиванию беременности и к бесплодию.

Цели и задачи исследования, пути их решения

Цель работы Домниной А.П. состояла в выделении и характеристике мезенхимных стволовых клеток из десквамированного эндометрия, содержащегося в менструальной крови человека и в изучении влияния трансплантации эМСК человека на развитие децидуальной оболочки у псевдобеременных крыс. Задачи работы фактически подразделяются на два раздела, каждый из которых требует своих приемов решения. Так, выделение фракции эМСК из менструальной крови, их культивирование и характеристика получаемых клеточных линий требует использования всего арсенала приемов культуральной работы, иммунофенотипирования, цитогенетики. Выполнение задач второго блока – разработка экспериментальной модели трансплантации эМСК животным и изучение влияния этих клеток на развитие децидуальной ткани требует использования приемов цитологической оценки состояния циклов у животных, хирургических приемов работы с животными, владения морфометрическими и гистологическими методами исследования.

Объем и структура диссертации

Диссертация А.П.Домниной изложена на 98 страницах, содержит 21 рисунок и 3 таблицы. Библиография включает 131 источник. Работа имеет классическую структуру и состоит из введения, обзора литературы, описания материала и методик исследования, результатов экспериментов, обсуждения, выводов и списка цитированной литературы.

В компактном обзоре литературы А.П. Домнина излагает основные этапы истории открытия и исследования стволовых клеток человека, акцентируя внимание на современном состоянии знаний об источниках эМСК и свойствах этих клеток. Приводятся данные о росте числа публикаций, посвященных МСК эндометриального происхождения, что свидетельствует о росте интереса к этим клеткам. В обзоре проведен анализ работ, выполненных на лабораторных животных с применением эМСК человека, и подчеркнуто, что в большинстве из них не применялись иммунодепрессанты, что связано с иммуномодулирующими свойствами трансплантируемых клеток. При сравнении гистологического строения эндометрия человека и лабораторных животных сделан акцент на том, что у человека, в отличие от грызунов, большие децидуальные клетки не являются полиплоидными, в остальных чертах организации и функционирования большие децидуальные клетки человека сходны с соответствующими клетками эндометрия крыс. Это заключение позволило автору строить эксперименты по изучению влияния эМСК человека на развитие эндометрия, используя в качестве модели псевдобеременных крыс.

Раздел «Материал и методика» написан четко, с пониманием и с достаточной степенью подробности, свидетельствующей о том, что соискатель своими руками и со знанием дела выполнила экспериментальную часть исследования.

Раздел, посвященный изложению результатов, написан четко, достаточно подробно и хорошо иллюстрирован.

Характеристика результатов и анализ выводов

Первая задача Домниной А.П. состояла в выделении из менструальной крови МСК, и изучении свойств культивируемых клеток. Указанное исследование выполнено с использованием современного арсенала методических средств, таких как культивирование клеток *in vitro*, иммуоцитохимическое выявление маркерных антигенов, индукция клеточной дифференцировки, проточная цитофлуориметрия. Описанные автором три клеточные линии были получены из объемов образцов менструальной крови в 1-2 мл. Автор обращает внимание на то, что источником ЭМСК является материал из базального слоя эндометрия, поэтому после эксплантации в разных чашках Петри наблюдалось неодинаковое выселение фибробластоподобных клеток. Поэтому для получения линий были отобраны те культуры, в которых было наибольшее количество адгезированных клеток. Это замечание полезно в качестве методической детали для последующих исследователей, а также для оценки данных, полученных в других лабораториях. В работе последовательно проведено изучение всех основных характеристик клеток полученных культур, позволяющих согласно международным критериям, отнести их к категории МСК. Наряду со стандартным набором поверхностных маркеров, проведено иммуогистохимическое выявление маркера плюрипотентности SSEA-4 и показана экспрессия этого белка в местах фокальных контактов в 50% клеток в культурах. В клетках всех трех полученных линий были выявлены марекры предрасположенности клеток к нейрональной дифференцировке - нестин и бета-3-тубулин. При этом указано, что исследование экспрессии бета-3-тубулина в ЭМСК другими исследователями ранее не проводилось. Для характеристики первичных клеточных линий важным является кариотипический анализ. Кариотипирование клеток в культурах было проведено с помощью дифференциальной окраски хромосом на G-диски на ранних (3 и 6) и на поздних (15 и 22) пассажах. При этом в культурах не были выявлены закономерные кариотипические отклонения, а отмеченные изменения хромосом были единичными и не получали пролиферативного преимущества в процессе культивирования клеток. Исследование ростовых характеристик ЭМСК показало значительное сходство времени удвоения всех трех культур, замедление темпов пролиферации к 13 пассажу. Клетки культур, прошедших 23-25 пассажей претерпевали

морфологические изменения — увеличивались в размерах и уплощались, при последующем пассировании в них проявлялись признаки старения, замедление и остановка пролиферации, а затем (после 40-45 пассажей) наступала гибель клеточных культур. Таким образом было сделано заключение, что ЭМСК сохраняют свои свойства на протяжении более 20 пассажей, имеют нормальный кариотип, который не претерпевает существенных изменений в процессе пассирования, не подвергаются спонтанной трансформации, претерпевают репликативное старение и погибают.

Помимо создания трех клеточных линий МСК и исследования их свойств в условиях культуры Домнина А.В. ставила целью изучить активность полученных клеток при трансплантации их экспериментальным животным. Биологической моделью для исследования служили псевдобеременные крысы. Задача состояла в оценке влияния МСК человека, введенных в ткань матки псевдобеременных животных, на развитие децидуальной оболочки. Выбор модели был продиктован перспективами разработки способов преодоления одного из вариантов невынашивания плода у человека, как следствия несостоятельности децидуальной оболочки. Автор работы выполнила тонкие хирургические операции на крысах, провела морфологическое и гистологическое исследование тканей после трансплантации МСК человека в сравнении с контрольными опытами, в которых животным вводили клетки костного мозга крыс. Результаты этих экспериментов позволили сформулировать выводы об адекватности выбранной модели для оценки активности МСК в отношении развития децидуальной ткани и о сохранении ее нормального гистогенеза.

Научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы

В исследовании Домниной А.В. получены новые научные данные. Так, впервые в ЭМСК был выявлен бета-3-тубулин. Впервые был предложен и апробирован способ оценки влияния трансплантации МСК на развитие эндометрия экспериментальных животных и сделана попытка изучения терапевтических свойств ЭМСК *in vivo* на модели псевдобеременности у крыс. Было выявлено стимулирующее действие трансплантированных МСК на развитие децидуальной ткани при сохранении ее гистологической структуры.

Рецензируемая работа содержит данные, представляющие практический интерес. Результаты изучения МСК эндометриального происхождения показали, что десквамированный эндометрий может служить источником полноценных активно пролиферирующих МСК, способных к дифференцировкам и не претерпевающих трансформации при длительном поддержании в культуре. Свойства трех независимо полученных клеточных линий оказались чрезвычайно близкими как по фенотипическим,

так и по ростовым характеристикам. Результаты всестороннего изучения свойств клеток полученных трех линий указывает на то, что эМСК могут служить моделью не трансформированных клеток человека для фундаментальных исследований в клеточной биологии, а также для прикладных работ в области фармакологии.

Содержание работы достаточно полно отражено в четырех опубликованных статьях, одна из которых помещена в зарубежном издании, а также в материалах российских и международных конференций.

Критические замечания и вопросы к дискуссии

Текст диссертации А.П. Домниной не лишен недостатков, которые имеют в основном редакторский характер и не снижают общей высокой оценки работы. Не ясно, почему в конце литературного обзора изложены данные результатов собственных экспериментов о влиянии эМСК на развитие эндометрия псевдобеременных крыс, подробно приведенные в дальнейшем тексте.

К сожалению ни в литературном обзоре, ни в разделе «Материал и методика», нет схематического рисунка, отображающего анатомию и клеточный состав ткани матки крыс. Такая схема помогла бы в описании процедур трансплантации эМСК и приготовления материала для гистологического исследования.

В разделе «Обсуждение» излишне повторены описанные в предыдущем разделе результаты исследования.

К замечаниям филологического плана можно отнести разнотильность написания текста - использование безличной возвратной формы глаголов в одних разделах и личной формы в прошедшем времени - в других. В тексте имеются синтаксические и орфографические опечатки, а также неудачные выражения.

Хорошо было бы представить в тексте данные подсчета количества клеток, которое можно получить из 1 мл менструальной крови в результате культивирования в течение 10 пассажей, т.е. до появления первых признаков старения культур.

Заключение

Диссертационное исследование А.П. Домниной «Эндометриальные стволовые клетки: получение, характеристика и применение для стимуляции развития эндометрия крыс» является завершенной квалификационной работой, содержит новые научные данные, представляющие интерес для фундаментальной биологии, фармакологии и экспериментальной медицины и отвечает 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 биологических наук, а ее автор заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология.

Официальный оппонент –  Самойлович Марина Платоновна,
доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник 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, rncrht@mail.ru

4. 06. 2014

