

ОТЗЫВ

Официального оппонента на диссертацию Гордеевой Ольги Федоровны
«Закономерности нормального и патологического развития
плюрипотентных стволовых и тератокарциномных клеток
млекопитающих», представленной на соискание ученой степени доктора
биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология,
цитология, гистология.

1. Актуальность избранной темы.

На протяжении последних десятилетий наблюдается все возрастающий интерес к использованию плюрипотентных стволовых клеток в клинической практике для лечения многих заболеваний. Этот интерес зачастую приобретает коммерческий привкус, опасность которого усугубляется потенциальной способностью этих клеток к онкогенной трансформации. Поиск новых маркеров для выявления ранних признаков такой трансформации, их мониторинга, а также разработка технологий для экспериментальной оценки онкогенного потенциала плюрипотентных стволовых клеток и их производных в моделях *in vitro* и *in vivo* является одной из «горячих точек» современной биологии и медицины. Другой, не менее «горячей» точкой, является разработка на основе плюрипотентных стволовых клеток тест-систем для оценки действия токсикантов и новых фармакологических средств, которые могут быть использованы как в регенеративной медицине, в геронтологии, онкологии, неврологии и многих других направлениях. Все эти аспекты биологии стволовых клеток свидетельствуют о несомненной актуальности диссертационного исследования Ольги Федоровны Гордеевой, отважившейся основной его целью заявить выявление закономерностей в молекулярных и клеточных механизмах самообновления, дифференцировки и морфогенеза плюрипотентных стволовых и тератокарциномных клеток мыши и человека.

2. Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.

Достоверность результатов диссертационного исследования О.Ф. Гордеевой, обоснованность основных положений, выводов и практических рекомендаций обеспечивается как современным уровнем и непротиворечивостью его исходных теоретических положений, разумной и адекватной задачам работы логикой плана исследования, применением надежных и апробированных методов, соответствующих поставленной в нем цели и задачам, корректной интерпретацией и количественным анализом полученных данных с использованием методов математической статистики, применяемых для медицинских и биологических исследований. Обоснованность научных положений и выводов исследования подтверждается сопоставлением собственных результатов с данными литературы.

3. Достоверность и новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.

В соответствии с поставленной целью исследования автором логично сформулированы его задачи, для решения которых были последовательно использованы современные информативные, апробированные методы исследования.

Достоверность проведенного автором исследования подтверждается большим экспериментальным материалом, весьма значительным количеством использованных клеточных линий мыши и человека, бестимусных и дикого типа мышей разных линий, тщательностью дизайна экспериментов. Основные положения, выносимые на защиту, обладают необходимой новизной, актуальностью и практической значимостью. В работе был использован комплексный подход к решению поставленной

проблемы, на основании которого автором было показано, что уровень экспрессии генов Oct4/OKT4 и Ddx4/DDX4 в нормальных клетках может служить индикатором удаленности от первичного статуса плюрипотентности. Установлен стадийноспецифичный и тканеспецифичный характер экспрессии раково-тестикулярных антигенов в процессе дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток мыши и человека, в то время как в клетках тератокарциномы, раковых клетках нейроэктодермального и мезодермального происхождения имеются нарушения их экспрессии, что может быть использовано для выявления трансформированных клеток в культурах. Важным представляются выявленные диссертантом механизмы нарушения баланса между процессами самообновления и дифференцировки в клетках тератокарцином мыши и человека, которые, как она полагает, связаны с гипоактивностью сигнальных путей факторов семейства TGF-beta и гиперактивностью PI3K/Akt и MEK/ERK-сигнальных путей. Следует отметить, что формулировка пункта 5 «Основных положений, выносимых на защиту» выглядит достаточно тривиально и ее трудно назвать совершенно новой. Аналогично, упомянутая в п.6 и ниже в «Практической значимости» «3D-модель *in vitro* дифференцировки... для изучения механизмов» активно используется во всём мире уже два десятка лет. То, что на динамику роста эмбриональных телец влияют особенности клеток и свойства питательной среды, известно, наверное, со времен Алексиса Карреля. Есть некоторые шероховатости в разделе «Научная новизна». То, что уровень экспрессии Oct4 (и нескольких других генов) является маркером «стволовости» известно уже лет 15.

Диссертационная работа О.Ф. Гордеевой написана по традиционному плану и включает введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и их обсуждение, выводы и список использованных источников. Текст диссертации изложен на 275 страницах,

содержит 68 рисунков 8 схем и 7 таблиц. Список литературы включает 573 источников, из них 11 в отечественных изданиях. Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

Основные результаты диссертации опубликованы в 38 печатных работах (в том числе, 22 в рецензируемых отечественных (17) и международных (5) журналах, 3 в сборниках и 13 тезисов конференций) обсуждались на всероссийских и международных конференциях, положительно оценены ведущими специалистами.

4. Значимость для науки и практики полученных автором результатов.

Значимость для науки данной работы состоит в выявлении транскрипционных профилей генов, специфических для линии половых клеток, и раково-тестикулярных антигенов, которые могут быть использованы для стандартизации линий плюрипотентных стволовых клеток при реализации клеточной терапии, обеспечения безопасности клеточных технологий.

5. Конкретные рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации

Полученные результаты и выводы диссертации соискателя могут быть рекомендованы для включения в курсы лекций при подготовке специалистов по клеточной биологии и регенеративной медицине.

6. Характеристика содержания диссертации, ее завершенности.

Диссертационная работа О.Ф. Гордеевой состоит из введения, обзора литературы, описания методов исследования, изложения результатов исследований, заключения, основных выводов, списка использованных источников. Во введении соискатель обосновала актуальность темы,

сформулировала цель и задачи исследования, научную новизну, теоретическую и научно-практическую значимость работы и положения, выносимые на защиту.

В обширном обзоре (44 стр.) автор дала характеристику различных линий плюрипотентных стволовых клеток различного происхождения, представила современные данные о стратегиях и методах получения и поддержания таких клеточных линий *in vitro*, рассмотрела особенности регуляции их самообновления и поддержания генетической стабильности в норме и, в связи с ней, проблемы злокачественной трансформации. Специальный раздел обзора включает описание линий тератокарцином. Обзор хорошо написан, легко читается и свидетельствует о высокой эрудиции автора.

Глава, посвященная описанию материала и методикам, использованным в работе, написана достаточно подробно дает представление о высокой квалификации диссертанта, профессионально владеющего самыми современными методами молекулярной биологии и онкологии.

В пяти разделах главы «Результаты» автор последовательно приводит полученные ею данные изучения механизмов поддержания базового и первичного плюрипотентного статуса в плюрипотентных стволовых и тератокарциномных клетках человека и мыши, результаты исследования особенностей экспрессии раково-тестикулярных антигенов в этих клетках, анализа регуляторных сигнальных путей в нормальных стволовых клетках и клетках тератокарцином.

Особый интерес для меня, как онколога, представили результаты изучения динамики роста и дифференцировки плюрипотентных стволовых и тератокарциномных клеток человека и мыши при их аллогенной и ксеногенной трансплантации под кожу или под капсулу почки. С моей точки зрения, этот раздел работы выполнен превосходно и полученные результаты

сделали бы честь любой лаборатории экспериментальной онкологии в мире. Автору удалось показать, что вероятность и эффективность развития опухолей могут существенно увеличиваться в случае аллогенной или аутологичной ее пересадки, а также в случае трансплантации тератокарциномных клеток. Важным наблюдением является установление порога резистентности систем противоопухолевой защиты (к ним относятся не только системы иммунного надзора). Не могу не вспомнить результаты наших 30-летней давности совместных исследований с Ю.Б. Вахтиным и Е.В. Каминской с внутривенным введением крысам разного возраста различного количества клеток рабдомиосаркомы РА-2, в которых мы также наблюдали феномен порогового числа привитых внутривенно клеток, образующих опухолевые узлы в легких. Было бы чрезвычайно интересно изучить на модели диссертанта роль возраста реципиента и донора – носителя опухоли.

Весьма перспективным и высокотехнологичным подходом к изучению действия цитостатиков по нашему мнению является разработанная О.Ф. Гордеевой модель, позволяющая *in vitro* оценивать их эмбриотоксическую, антипролиферативную и, в конечном счете, противоопухолевую активность новых лекарственных препаратов.

Прекрасно написана и блестяще иллюстрирована глава «Обсуждение», в которой дан сжатый, но очень емкий по содержанию и научной значимости анализ полученных автором данных и перспективах их применения в этой бурно развивающейся области биомедицины.

Выводы и практические рекомендации основаны на фактическом материале и соответствуют задачам, поставленным диссертантом в работе.

Автореферат диссертации и опубликованные по теме научные работы полностью соответствуют цели и основным положениям выполненной работы.

7. Достоинства и недостатки диссертации.

Диссертация О.Ф. Гордеевой неординарна по замыслу, методическому уровню, полученным результатам и отвечает самым высоким стандартам. Это многогранный, комплексный и, при этом, завершённый труд. Высказанные нами выше замечания носят редакционный характер и не снижают самого благоприятного впечатления от всей работы.

В качестве дискуссии хотелось бы получить от автора ответы на следующие вопросы:

1. Наблюдения диссертанта о невысоком уровне пластичности клеточной линии HESC-1 подтверждают данные J. Rhim и R. Kremer, опубликованные в монографии Human Cell Transformation: Role of Stem Cells and the Microenvironment. Собственно говоря, линия HESC-1 не является линией чЭСК, - а является линией immortalized клеток эпителия среднего уха взрослых (Chun et al., 2002). ES в её индексе означает не embryonic stem, а endolymphatic sac. Возможно, автор имеет в виду какую-то другую линию клеток?
2. Как автор интерпретирует тот факт, что Gata-4 - специфичный маркер ранней кардиомиоцитарной дифференцировки, экспрессируется даже в недифференцированных клетках, использованных в эксперименте? Не указывает ли это на гетерогенность клеточных популяций (частичная спонтанная дифференцировка клеток, считаемых автором недифференцированными)?
3. Автор делает совершенно верный вывод о роли тканевого микроокружения в развитии тератомы исходя из результатов эксперимента весьма ограниченного масштаба (2 сайта трансплантации). Не пробовали ли трансплантировать нормальные клетки и клетки тератокарциномы в какие-нибудь другие сайты (в т.ч. «иммунологически привилегированные»).

Хочется отметить, что диссертация написана хорошим литературным языком, великолепно иллюстрирована высокого качества схемами, рисунками, макро- и микрофотографиями и было бы полезно издать её в виде монографии.

Заключение

Таким образом, считаю, что диссертация **«Закономерности нормального и патологического развития плюрипотентных стволовых и тератокарциномных клеток млекопитающих»** соответствует всем требованиям п.9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора биологических наук, а Гордеева Ольга Федоровна заслуживает присуждения ей ученой степени доктора биологических наук по специальности «03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология».

Заведующий научным отделом канцерогенеза
и онкогеронтологии, научной лаборатории
канцерогенеза и старения
НИИ онкологии им. Н. Н. Петрова
Министерства здравоохранения РФ,
член-корреспондент РАН,
доктор медицинских наук, профессор

Анисимов Владимир Николаевич

Адрес: 197758 Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, д. 68;
Тел.: (812) 439-9534; E-mail: aging@mail.ru

