

Отзыв

на автореферат диссертации О.Ф. Гордеевой «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

Раскрытие биологических и биотехнологических свойств стволовых клеток (СК) млекопитающих является одной из наиболее важных и увлекательных задач нашего времени. Рецензируемая работа посвящена, в первую очередь, так называемым плюрипотентным эмбриональным стволовым клеткам (ЭСК), которых выделяют из внутренней клеточной массы (ВКМ) бластоцист. По заявлению автора «основная цель работы: выявить закономерности в молекулярных и клеточных механизмах самообновления, дифференцировки и морфогенеза плюрипотентных стволовых и тератокарциномных клеток мыши и человека». Как объекты исследования, плюрипотентные эмбриональные стволовые клетки, так и заявленные цели позволяют охарактеризовать работу как фундаментальное исследование. Разносторонние задачи решались с использованием как морфологических и цитохимических, так и современных иммунохимических и молекулярных методов исследования. Сопоставления морфологии и цитохимии клеток и клеточных структур с их молекулярными свойствами делает результаты работы обоснованными и наглядными.

При получении ЭСК в культуре для изучения и решения биотехнологических задач, начальные усилия исследователей направлены на сохранение у культивируемых ЭСК способности к пролиферации и дифференцировке в различные типы клеток (плюрипотентность). С другой стороны, изучение дифференцировочных свойств ЭСК – это возможность изучения начальных стадий эмбриогенеза млекопитающих. Известно, что одним из первых дифференцировочных признаков, обнаруженных в ВКМ бластоцист, является экспрессия антигенов, специфичных для первичных половых клеток. Способность участвовать в развитии не только соматических клеток, но и линии половых клеток является основным отличием клеток, образующих ВКМ и находящихся в статусе базовой плюрипотентности (ground/naïve state), от более продвинутых в развитии клеток в статусе primed state, выделяемых из эпибласта эмбрионов.

Автор впервые показал, что клеточно-специфический антиген половых клеток Vasa/Mvh/Ddx4 экспрессируется на уровне мРНК и белка в мЭСК и в бластоцистах мышей (E4.5), находящихся в базовом статусе плюрипотентности, наряду с экспрессией таких маркеров половых клеток как Stella, Fragilis, Dazl, E-ras и маркеров плюрипотентности Oct4 и Nanog. Экспрессия гена Ddx4 в эпибласте мышей (E6.5) и в зачатках гонад (E10.5) оказалась значительно сниженной и вторично возрастала в гонадах на стадии E13.5. В чЭСК уровень экспрессии Ddx4 был ниже и по данным

иммуногистохимического анализа не был выявлен в колониях недифференцированных cЭСК ESM01, ESM02 и ESM03.

Встает вопрос о механизмах резкого снижения экспрессии Ddx4 при образовании эпибласта у мышей! Является ли экспрессия Ddx4 на стадии E4.5 проявлением только плюрипотентных свойств ВКМ и гетерогенности популяции ВКМ, тем более, что клетки эпибласта мышей не способны к развитию в линии половых клеток? Становятся ли Ddx4-положительные клетки ВКМ предшественниками зрелых половых клеток?

Автор предполагает что «паттерн экспрессии гена DDX4 преддетерминирован в клетках млекопитающих для сохранения потенциала к формированию линии половых клеток, и что этот ген Vasa/Mvh/Ddx4 можно рассматривать как ещё один молекулярный детерминант базового статуса плюрипотентности».

Несомненным достижением автора в иммунохимическом анализе эмбриогенеза мышей и человека стало обнаружение в ЭСК и в клетках тератокарцином частичной экспрессии так называемых раково-тестикулярных антигенов (РТА), характерных для тестикулярных опухолей взрослых, обозначенных как MAGE. При этом в клетках тератокарциномы человека были обнаружены только антигены MAGE-A2 и MAGE B2, экспрессия которых не обнаруживалась в недифференцированных чЭСК. Автор предлагает использовать экспрессию этих антигенов для обнаружения трансформированных ЭСК человека при культивировании ЭСК для терапевтических целей. Можно согласиться с автором, что результат может иметь большое научно-практическое значение.

Автор также углубил имеющиеся представления о сигнальной регуляции самообновления и дифференцировки ЭСК на базовой стадии плюрипотентности и в состоянии primed state, выявив различия уровней экспрессии ростовых факторов TGF β 1, BMP4, ActivinA и FGF2. По данным автора, поддержание недифференцированного состояния плюрипотентных мЭСК и ЭСК человека достигается с помощью различных схем регуляции ветвей TGF β сигналинга. Привлекают внимание данные о том, что для самообновления чЭСК необходимы экзогенные факторы ActivinA и FGF2, происходящие из фидерных клеток. Низкие уровни экспрессии этих факторов в чЭСК клетках приводит к снижению антипролиферативных сигналов и нарушению инициации дифференцировки. Понижение потенции к дифференцировке у плюрипотентных стволовых клеток и у нуллипотентных тератокарциномных клеток связано с усилением активности сигнальных путей, регулирующих клеточную пролиферацию, PI3/Akt и MEK/ERK.

Автор предложил использовать дифференцировку эмбрионидных тел (ЭТ) ЭСК для тестирования эмбриотоксичности химических веществ. Предварительно было установлено, что в системе стволовых клеток мЭСК, мЭГК и мЭТК динамика дифференцировки ЭТ зависит от происхождения клеток. Наиболее быстро дифференцируются клетки мЭСК. В наименьшей степени скорость дифференцировки ЭТ зависит от исходного числа клеток,

2

образующих ЭТ. Пролиферация и дифференцировка наружного слоя клеток внезародышевой энтодермы сопровождается торможением роста эмбрионов и гибелью ЭТ. Эффекты всех цитостатиков одинаковы для ЭТ любого происхождения. Однако, оказалось, что в процессе дифференцировки от мЭСК до ЭК10 происходит уменьшение чувствительности ЭТ к действию цитотоксических агентов из-за усиления барьерной функции внезародышевой энтодермы, покрывающей ЭТ снаружи. При этом клетки центра ЭТ выживали лучше чем клетки поверхности ЭТ и были способны к восстановлению роста и дифференцировке после отмены цитостатика. Автор считает, что 3D структура ЭТ более близка к эмбрионам млекопитающих и поэтому ЭТ более подходят как модель для эмбриотоксических исследований чем культивируемые 2D клетки ЭСК.

Многоплановость работы хорошо отражена в литературном обзоре. Автор критически проанализировал более 500 работ по всем аспектам ЭСК. Учитывая большой интерес к проблемам развития, плюрипотентности и дифференцировки ЭСК на фоне отсутствия практических достижений в восстановительной терапии а также значительный вклад автора в изучение ЭСК было бы очень полезным для специалистов иметь данную работу изданной в виде монографии.

Автореферат диссертации отражает основные положения и дает представление об объеме сделанной работы и полученных результатах. Материалы опубликованы в российских и международных изданиях, были представлены на многочисленных отечественных и международных конференциях. Работу характеризуют актуальность, новизна, успешное сочетание традиционных для эмбриологии морфо-анатомических подходов с широким арсеналом современных культуральных и молекулярных методов исследования, оригинальность и достоверность выводов, что дает основание считать работу удовлетворяющим требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук (п.9 «Положения о присуждении ученых степеней» утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года). Считаю что автор диссертации, Ольга Федоровна Гордеева, заслуживает искомой степени доктора биологических наук по специальности «03.03.04-клеточная биология, цитология, гистология».

Руководитель группы генетики клеточных популяций Отдела внутриклеточной сигнализации и транспорта Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт цитологии Российской академии наук, доктор биол. наук, профессор

В.М. Михайлов

Вячеслав Михайлович Михайлов

г. Санкт-Петербург, 194064, Тихорецкий проспект, д.4, ИИЦ РАН,
тел.(812) 2971846; E.mail: vmikhailov@mail.cytspb.rssi.ru

03.02.2015 г.

Подпись руки *Михайлова В.М.*
03.02.2015 г.
Заверяю
В.М. канцелярией

