

Отзыв официального оппонента на диссертационную работу

Худякова Александра Александровича

«Изучение роли сигнального пути Wnt в развитии аритмогенной кардиомиопатии на модели индуцированных плюрипотентных стволовых клеток»,

представленную к защите на соискание учёной степени кандидата биологических наук
(специальность 03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология)

Актуальность и новизна диссертационного исследования

Получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) из соматических клеток человека является одним из важнейших достижений в области изучения и применения стволовых клеток. Разработка технологии получения ИПСК открыла ряд новых возможностей не только для исследований раннего эмбрионального развития млекопитающих, особенностей поддержания плюрипотентного состояния, механизмов регуляции экспрессии генов, но и для их практического использования.

Моделирование заболеваний при помощи ИПСК является перспективной технологией, получившей широкое распространение. Репрограммирование соматических клеток пациента-носителя мутации до плюрипотентного состояния с их последующей дифференцировкой позволяет получать культуры клеток, определённого типа несущие все генетические изменения исходных клеток. Помимо этого, ИПСК позволяют изучать влияние генетических изменений на процесс клеточной дифференцировки, что позволяет воспроизводить различные стадии заболевания. Сейчас в России только несколько лабораторий используют технологию генетического репрограммирования, еще меньше – занимаются моделированием заболеваний с помощью ИПСК. Работа А.А. Худякова очень актуальна, так как вносит свой вклад в хотя бы частичное приближение российской биологии к тенденциям и уровню науки мировой.

В диссертационной работе А. А. Худякова впервые были установлены следующие важные закономерности, касающиеся механизмов развития аритмогенной кардиомиопатии:

- впервые показано, что в ходе кардиогенной дифференцировки ИПСК от пациентов с АКМП изменена активность сигнальных путей Wnt и Notch;
- впервые обнаружена связь между уровнем экспрессии *PKP2* дикого типа и активностью сигнального пути Wnt, в ходе кардиогенной дифференцировки ИПСК;

- впервые показано изменение активности сигнального пути Wnt в мультипотентных мезенхимных стромальных клетках жировой ткани и мезенхимных клетках сердца, полученных от пациентов с АКМП.

Общая характеристика работы

Диссертация построена по традиционному плану, изложена на 135 страницах машинописного текста, состоит из следующих глав: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты, обсуждение, выводы и список цитируемой литературы, содержащий 244 наименования.

Материалы диссертации иллюстрированы 42 рисунками и 4 таблицами. В обзоре литературы приведены обширные данные об известных на сегодняшний день методах получения ИПСК и их дифференцировки в направлении кардиомиоцитов. Описаны белки, входящие в состав десмосомы, и выполняемые ими функции. Автором подробно рассмотрены известные молекулярные и клеточные механизмы развития аритмогенной кардиомиопатии.

В своей диссертационной работе А. А. Худяков использовал широкий спектр современных методов: культивирование ИПСК человека и их последующую дифференцировку, внесение трансгенов в клетки путём лентивирусной трансдукции, анализ активности люциферазы в составе репортерных конструкций, иммуноцитохимические методики, электрофорез и иммуноблоттинг, анализ экспрессии генов методом ПЦР в режиме реального времени. Все использованные в работе методы адекватны поставленным задачам.

Из несомненных достоинств работы хочется отметить очень грамотно и аккуратно сформулированные положения, выносимые на защиту и выводы. В качестве пожелания хотелось бы видеть в работе более ясное утверждение того факта, что мультипотентные мезенхимные стромальные клетки жировой ткани и мезенхимные клетки сердца не способны к дифференцировке в функциональные кардиомиоциты. Это важно, так как эти клетки рассматриваются до сих пор некоторыми исследователями как хорошие источники кардиомиоцитов для терапии.

Несмотря на очевидный успех работы в целом (автору удалось найти в полученных дифференцированных производных ИПСК, а также в соматических клетках пациентов с АКМП проявления заболевания на молекулярном уровне) работа не лишена недостатков.

1. Несмотря на то, что диссертант достаточно подробно описал процесс дифференцировки ИПСК в кардиомиоциты, эффективность дифференцировки количественно не оценивалась, из чего не ясно, насколько одинаковыми и чистыми были популяции, которые использовали в дальнейшем для ПЦР в реальном времени.
2. При описании результатов количественных ПЦР в реальном времени автор постоянно использует «неколичественную» терминологию – «немного больше», «несколько меньше», что затрудняет понимание, достоверен ли статистически результат, или нет.
3. При характеристике ИПСК, Рис. 13 В Продукты ПЦР Oct4 не одинакового размера?
4. Рис18, б – характеристика кардиомиоцитов, дифференцированных из ИПСК. Результаты образца Д2 неубедительны. Там практически не видно никакой экспрессии кардиоспецифичных генов.
5. При культивировании ИПСК среда заменялась на свежую три раза в неделю, хотя все протоколы говорят о ежедневной смене среды. Не могло ли сказаться на способности к дифференцировке ИПСК нарушение технологии их культивирования?
6. Японская фамилия «Яманака» в русском языке не склоняется.

Высказанные замечания не снижают высокий научный уровень диссертационной работы. По теме диссертации опубликовано 12 печатных работ, в том числе 9 статей (в том числе 4 статьи в рецензируемых научных журналах из перечня изданий, рекомендованных ВАК РФ) и 3 тезисов. Материалы диссертации были представлены на VII Ежегодной научной конференции молодых ученых и специалистов СЗФМИЦ им. В.А. Алмазова (Санкт-Петербург, 2015), конференции молодых ученых Института цитологии РАН по биологии клетки в культуре (Санкт-Петербург, 2014) и на научных семинарах Института молекулярной биологии и генетики ФГБУ “Северо-западный федеральный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова” Минздрава РФ.

Заключение

В целом диссертация А. А. Худякова, выполненная на высоком научном и методическом уровне, заслуживает высокой оценки; в ходе её выполнения получены новые данные по актуальной проблеме. Считаю, что диссертационная работа Александра Александровича Худякова «Изучение роли сигнального пути Wnt в развитии аритмогенной кардиомиопатии на модели индуцированных плюрипотентных стволовых клеток», выполненная под руководством д.б.н., член-корр. РАН Алексея Николаевича Томилина и к.б.н. Анны Борисовны Малашичевой, является законченной квалификационной работой, содержит новые данные о механизмах, лежащих в основе развития аритмогенной кардиомиопатии и новых функциях белка десмосом плакофиллина-2. Считаю, что диссертация соответствует требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» № 842 от 24 сентября 2013 года, предъявляемым к кандидатским диссертациям, утвержденному постановлением Правительства Российской Федерации, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология.

Заведующая лабораторией клеточной биологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства», Москва доктор биологических наук по специальностям 03.02.07 – «генетика» и 03.03.04 – «клеточная биология, цитология, гистология»

25 марта 2016 г.



М. А. Лагарькова

Адрес: 119435, Москва, Малая Пироговская, д. 1а., <http://www.fncb.ru>

ФГБУ ФНКЦ ФМБА

тел.: +7(495)

e-mail: maryalag@yahoo.com

*подпись заверен
ученой секретарь Валу*

