

Отзыв официального оппонента на диссертацию М.А. Шилиной на
тему:

«ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ И ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА
ЭНДОМЕТРИАЛЬНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК
ЧЕЛОВЕКА В КУЛЬТУРЕ»,

представленную на соискание ученой степени кандидата биологических
наук по специальности 03.03.04 – Клеточная биология, цитология,
гистология

Актуальность темы исследования

Стволовые клетки (СК) человека представляют несомненный интерес в связи с их возможным практическим использованием в медицине. Более того регенеративная медицина с применением мезенхимных стволовых клеток крайне перспективное направление. На данный момент идет постоянный поиск новых источников стволовых клеток взрослого организма, унификация протоколов их получения и оценка параметров и безопасности клеточного продукта. В качестве источника МСК до недавнего времени чаще всего служил костный мозг, жировая ткань, пуповинная кровь. В диссертационной работе М.А. Шилиной исследуются мезенхимные стволовые клетки, полученные из сравнительно недавно открытого источника СК – эндометрия. Клетки, полученные диссертантом получены из десквамированного эндометрия менструальной крови. МСК из десквамированного эндометрия имеют ряд преимуществ по сравнению с другими типами МСК в силу их доступности, возможности неинвазивного метода получения исходного материала, высокой пролиферативной активности и мультипотентности. В связи с тем, что использование МСК в регенеративных целях связано переводом клеток в систему *in vitro* и их культивированием могут возникать потенциальные риски, сопряженные со злокачественной трансформацией этих клеток или потерей ими функциональной активности.

Цели и задачи исследования, пути их решения

В своей работе М.А. Шилина исследовала различия между клеточными культурами ЭМСК от разных здоровых доноров, как здоровых, так и с заболеванием репродуктивной системы – аденомиозом (одного из видов эндометриоза), а так же ЭМСК после стрессового воздействия повышенной температурной.

В связи с этим была сформулирована цель работы - изучить генетические и физиологические характеристики эндометриальных мезенхимных стволовых клеток человека, полученных от разных доноров, при их культивировании в стандартных условиях и после теплового шока.

Для достижения поставленной цели диссертантом удачно и четко были сформулированы 5 задач работы:

1. Охарактеризовать эндометриальные мезенхимные стволовые клетки человека, полученные от здоровых доноров, по некоторым физиологическим (типу роста, мультипотентному статусу, экспрессии поверхностных маркеров, пролиферативной активности) и генетическим (морфологической и молекулярной структуры кариотипа) параметрам.
2. Охарактеризовать эндометриальные мезенхимные стволовые клетки человека от донора с аденомиозом по некоторым физиологическим (типу роста, мультипотентному статусу, экспрессии поверхностных маркеров, пролиферативной активности) и генетическим (морфологической и молекулярной структуры кариотипа) параметрам.
3. Сравнить физиологические и цитогенетические характеристики эндометриальных мезенхимных стволовых клеток человека от больного и здоровых доноров.
4. Оценить стабильность потомков эндометриальных мезенхимных стволовых клеток, переживших сублетальное тепловое воздействие, с помощью G-бандирования хромосом, молекулярного кариотипирования и транскриптомного анализа.

5. Оценить, способны ли клетки в процессе культивирования immortalizироваться и перейти в трансформированное состояние.

Особо необходимо отметить, что для выполнения поставленных задач автором было выбрано оригинальное сочетание традиционных и современных методов исследования клеток.

Общая характеристика работы

Диссертация М.А. Шилиной изложенная на 118 страницах, построена по классическому плану и включает введение, обзор литературы, описание материала и методик исследования, результаты экспериментов, обсуждение, заключение, выводы и список цитируемой литературы, включающего 205 источников. Иллюстративный материал содержит 42 рисунка и 2 таблицы. Во введении ясно изложена цель работы, отражены основные достижения автора и его вклад в исследование.

Обзор литературы написан правильным научным языком и хорошо обрисовывает как основные черты биологии стволовых клеток, так и методическую проблематику получения и использования мезенхимных стволовых клеток.

Использованные материалы и методы описаны достаточно четко.

Все поставленные в данной работе задачи были успешно диссертантом выполнены. Достоверность результатов данного диссертационного исследования не вызывает сомнений.

В разделе «Обсуждение» автор проводит критический анализ полученных результатов и сопоставление их с имеющимися в литературе. Хочется отметить прекрасное знание автором данных других исследователей по проблематике вопроса, умение их сопоставить и критически подойти к оценке собственных результатов.

Выводы работы обоснованы, четко сформулированы и вполне соответствуют поставленным в работе задачам.

Диссертация написана грамотным языком, хорошо проиллюстрирована и легко с интересом читается.

Материалы диссертации полно отражены в 5 статьях и 15 тезисах.

Научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы

Работа М.А. Шилиной имеет как фундаментальную, так и прикладную направленность.

В рамках данной работы были исследованы физиологические и генетические характеристики эМСК в культуре и возможность спонтанной трансформации клеток в процессе длительного культивирования.

Особо хочется отметить новизну полученных результатов.

В результате выполнения диссертационной работы впервые изучены характеристики линии эМСК от донора с аденомиозом и проведен их анализ в сравнении с клетками от здоровых доноров. Стоит отметить, что подобных исследований СК от донора с данной формой эндометриоза до этого момента не было. Являются значимыми данные о том, что на фоне однотипности клеток от здоровых и больного доноров по изученным физиологическим свойствам, кариотипическая характеристика клеток от донора с заболеванием выявила повышенную их нестабильность, с преимущественным вовлечением в перестройки определенных хромосом, а именно хромосом 7 и 11. Полученные диссертантом данные являются оригинальными, важными и вносят вклад в медицинские исследования, связанные с заболеваниями женской репродуктивной системы.

Также интересно отметить, что в рамках данной работы впервые изучены генетические характеристики потомков эМСК, переживших сублетальный ТШ. Подобное исследование так же проведено впервые. Данные полученные в рецензируемой работе представляет особый интерес, как для фундаментальных исследований биологии стволовых клеток, так и для прикладных задач регенеративной медицины.

Критические замечания

Рецензируемая работа М.А.Шилиной не лишена некоторых недостатков, которые, однако, носят дискуссионный характер и ни в коей мере не ставят под сомнение значимость результатов и обоснованность выводов.

С позиции оппонента, такие характеристики, как тип роста клеточной культуры, мультипотентный статус, экспрессия поверхностных маркеров, пролиферативная активность клеток – это скорее эпигенетические, свойства, нежели физиологическими изменениями.

Второе замечание связано с достаточно категоричным утверждением диссертанта, что кариотипические изменения, возникающие в процессе культивирования, не приводят к их иммортализации и трансформации и тот факт, что эМСК всех проанализированных линий в процессе длительного культивирования входили в фазу репликативного старения, позволяет сделать вывод о том, что они не подвергаются иммортализации и трансформации. Однако в связи с тем, что объем исследования не очень велик, нельзя исключить, что такие события все – таки могут реализоваться с некоторой вероятностью, которую автор не пытается оценить.

Заключение

Диссертационная работа Шилиной М.А. на тему «Физиологическая и генетическая характеристика эндометриальных мезенхимных стволовых клеток человека в культуре», выполнена на высоком методологическом уровне, представляет собой целостное, законченное исследование и заслуживает высокой оценки. В ходе данной работы получены новые данные в области биологии стволовых клеток. Диссертационная работа М.А. Шилиной выполненная под руководством академика Николая Николаевича Никольского, является законченной квалификационной работой и полностью отвечает требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения научных

степеней» (утвержденного Постановлением Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 г.), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология.



Филатов Михаил Валентинович,
кандидат биологических наук
по специальности 03.01.01 – Радиобиология,
Заведующий лабораторией Клеточной биологии
Петербургского института ядерной физики
им.Б.П.Константинова (НИЦ Курчатовский институт),
Адрес: Ленинградская обл., г.Гатчина, Орлова Роща
Петербургский институт ядерной физики
Телефон: 88137146626
Email: fil53ster@gmail.com

Подпись В.В. Саранцева



Заместитель директора
по научной работе
Саранцева С.В.