

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 взрослого организма в настоящее время являются предметом интенсивных исследований. Анализ данных публикаций, а также материалов прошедших в последние два года научных конференций, посвященных проблемам получения и изучения свойств мезенхимных стволовых клеток (МСК), свидетельствуют о том, что на повестку дня встают новые вопросы, касающиеся сохранения генетической стабильности и функциональных свойств клеток при наращивании клеточной массы в культуре, зависимости свойств клеток от индивидуальных особенностей донора клеточного материала, а также различий в поведении культивируемых клеток, получаемых из разных тканевых источников. Рецензируемая работа Шилиной М.А. находится в русле решения этих актуальных задач.

В рецензируемой работе объектом изучения выбраны стволовые клетки, выделяемые из десквамированного эндометрия менструальной крови. МСК этого происхождения изучены значительно менее полно, чем МСК, происходящие из костного мозга или жировой ткани. Менструальная кровь как источник МСК имеет ряд преимуществ в силу доступности материала и отсутствия необходимости его ферментативной обработки, что существенно для сохранения жизнеспособности эксплантируемых клеток и для оценки возможности их дальнейшего клинического применения. Кроме того, 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

Формулируя задачи исследования, автор задает четыре основных вопроса. Во-первых, имеются ли морфологические, генетические и функциональные различия между образцами культур эМСК, получаемых от разных здоровых доноров. Во-вторых, имеются ли различия в культурах МСК, полученных от здоровых доноров и пациенток с аденомиозом, и каких свойств они касаются. В-третьих, изменяется ли кариотип клеток в

процессе длительного культивирования и имеют ли изменения стойкий направленный характер, который может приводить к малигнизации клеток. Наконец, ставится вопрос о влиянии сублетальных стрессовых воздействий в процессе культивирования на основные функциональные свойства и кариотип клеток и их потомков. Для решения поставленных задач автором выбран современный и достаточно оригинальный подход, сочетающий использование традиционных методов исследования клеток (иммунофенотипирование, иммуноцитохимия, индукция направленной дифференцировки, морфологическое кариотипирование окрашенных на G-диски хромосом) и самых современных приемов молекулярного кариотипирования, а также анализа полногеномного транскриптома.

Объем и структура диссертации

Диссертация М.А. Шилиной изложена на 118 страницах, содержит 42 рисунка и 2 таблицы. Библиография включает 205 источников. Работа построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, описания материала и методик исследования, результатов экспериментов, обсуждения, заключения, выводов и списка цитированной литературы.

В обзоре литературы автор дает краткую информацию о типах стволовых клеток с точки зрения их происхождения и дифференцировочных потенций и делает акцент на особенностях эндометрия как источника МСК. Автор приводит сведения о первых опытах использования эМСК на людях для лечения рассеянного склероза, мышечной дистрофии Дюшена, хронической сердечной недостаточности. Отдельный раздел посвящен механизмам контроля целостности клеточного генома. Специальное внимание автор уделяет также вопросам генетической нестабильности клеток, выделенных из очагов эндометриоза. Разделы «Методы исследования» и «Результаты» изложены достаточно сжато. В разделе «Обсуждение» автор сравнивает особенности использованных методов анализа кариотипа и с этой точки зрения трактует значимость полученных результатов.

Характеристика результатов и анализ выводов

Первый раздел работы посвящен общей оценке морфологии, спектра поверхностных маркеров и дифференцировочным потенциям четырех линий эМСК, полученных из материала здоровых доноров. Совокупность этих результатов позволила заключить, что клетки всех линий удовлетворяют критериям идентификации их как МСК. Было также показано, что эМСК всех линий имеют сходную и высокую пролиферативную активность на ранних пассажах культивирования. Эти данные послужили основой для формулирования первого вывода диссертации.

Кариотипический анализ, проведенный на ранних сроках культивирования клеток методом G-бандирования, показал, культуры ЭМСК содержат кариотипически аномальные клетки, количество которых определяется индивидуальными особенностями донора клеточного материала. Отклонения кариотипа от принятой нормы выражались в анеуплоидии, моносомиях и в трисомиях по отдельным хромосомам, в поломках и транслокациях. Каждая из 4-х линий ЭМСК, выделенных от здоровых доноров, имела свой профиль и свою временную динамику проявлений этих отклонений. Не было выявлено общего тренда изменений во всех линиях. Эти результаты обобщены во втором выводе.

Линия ЭМСК, выделенная от пациентки с аденомиозом, отличалась от остальных линий более высокой частотой встречаемости аномального кариотипа, а также выраженностью неслучайных поломок, которые затрагивали хромосомы 7 и 11, что отражено в третьем выводе диссертации.

Сопоставление данных, полученных для всех клеточных линий при анализе методом G-бандирования и с помощью молекулярного кариотипирования, не совпадали, что могло быть объяснено разными принципами и различной разрешающей способностью этих методов.

Сублетальное стрессорное воздействие (в работе использован тепловой шок) индуцировало блок клеточного цикла в фазе G2/M и G0/G1. Только единичные клетки в период первых 72 часов имели маркер пролиферации Ki67. Одновременно происходило увеличение количества клеток, в которых выявлялись разрывы ДНК и обнаруживалась активность SA-β-галактозидазы-маркера репликативного старения. Таким образом было показано, что в результате стрессорного воздействия клетки претерпевают преждевременное старение и не входят в пролиферацию, что является нормальным ответом клеток на стресс. После пересева клетки возобновляли пролиферацию, сохраняли исходно присущие поверхностные маркеры и способность к дифференцировке, однако проявляли признаки вспышки кариотипической нестабильности. Выявленные в клетках кариотипические изменения не приводили к иммортализации и клеточной трансформации. Транскриптомный анализ потомков клеток, переживших тепловой шок, также показал, что в них не происходили изменения энергетического обмена и активности провоспалительного сигналинга, которые могли бы приводить к росту онкогенности клеток. Результаты исследования действия теплового шока на ЭМСК и их потомков обобщены в четвертом и пятом выводах.

Наконец, итог всей работы сформулирован в шестом выводе. В котором утверждается, что все исследованные линии ЭМСК в результате длительного

культивирования вступали в фазу репликативного старения и не подвергались трансформации.

Научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы

В результате выполненного исследования автором получены новые научные результаты, имеющие принципиальное значение для оценки перспектив клинического использования эМСК. Исследование физиологических свойств линий эМСК показало, что клетки, полученные от пациентки с аденомиозом не отличаются от клеток, выделенных от здоровых доноров. Аналогичных данных в научной литературе не имеется. Все линии эМСК, полученные от здоровых доноров, а также культура, выделенная от пациентки с аденомиозом, после 26-30 пассажа переставали делиться и входили в фазу репликативного старения. Следовательно, кариотипические отклонения клеток от нормы, обнаруженные на ранних этапах культивирования, а также их динамические изменения в процессе культивирования не приводят к иммортализации и трансформации. Практически важным является заключение о том, что при отборе и подготовке материала для клеточной терапии следует использовать сочетание нескольких методов генетического анализа. Метод молекулярного кариотипирования выявляет изменения кариотипа, если они затрагивают не менее 10-15% клеточной популяции, при этом улавливаются перестройки, захватывающие 0,5-1 Mb. Метод G-бандирования позволяет выявить только перестройки, превышающие размером 5 Mb. Результаты, полученные с помощью метода G-бандирования и методом молекулярного кариотипирования дополняют друг друга.

Существенным представляются данные о том, что эМСК, претерпевшие нелетальный тепловой шок, после пересева возобновляют пролиферацию и сохраняют способность к дифференцировке. В этих клетках отмечается активация путей клеточного цикла, которая сбалансирована с индукцией онкосупрессоров. Вспышка кариотипической нестабильности, возникающая в клетках после теплового шока, не приводит к стойким, закрепляемым отбором, изменениям кариотипа и трансформации. Данные полногеномного транскриптомного анализа потомков эМСК, переживших нелетальное стрессорное воздействие, также не выявляют классических признаков онкогенности и позволяют заключить, что изменения в этих клетках носят адаптивный характер и не ведут к их иммортализации.

Материалы диссертации с достаточной полнотой отражены в 5 статьях и 15 тезисах.

Критические замечания и вопросы к дискуссии

Рецензируемая работа М.А.Шилиной не лишена недостатков, которые однако не ставят под сомнение значимость результатов и обоснованность выводов.

Не ясно, почему исследование кариотипа методом G-бандирования выполнено на пяти линиях ЭМСК на ранних пассажах, на трех линиях на средних пассажах и на одной линии на позднем пассаже. При этом выбор линий для исследования не мотивирован.

Не приведены сведения о количестве повторностей экспериментов, в ряде случаев не представлены статистические параметры (время удвоения, графики роста культур).

При описании молекулярного кариотипирования следовало бы привести основные схемы и принципы этого метода исследования, чтобы в большей степени можно было анализировать значимость приведенных результатов и причины расхождения данных, полученных с помощью разных методов.

Не ясно, почему при транскриптомном анализе потомков ЭМСК, переживших тепловой шок, среди прочих рассматривались генные модули, отвечающие за киллерную активность.

Заключение

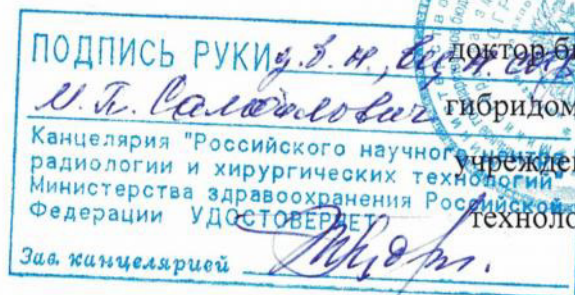
Диссертационная работа Шилиной М.А. на тему «Физиологическая и генетическая характеристика эндометриальных мезенхимных стволовых клеток человека в культуре», по актуальности, поставленным целям и задачам, объему проведенных исследований, новизне полученных результатов, их научной и практической значимости, 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.

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



23. 04. 2017