

«УТВЕРЖДАЮ»
Директор Федерального государственного
бюджетного научного учреждения
«Научно-исследовательский институт акушерства,
гинекологии и репродуктологии
имени Д.О. Отта»
академик РАН, проф.
Э.К. Айламазян



" 16 " мая 2017 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ
на диссертацию Шилиной Марии Александровны "Физиологическая
и генетическая характеристика эндометриальных мезенхимных
стволовых клеток человека в культуре", представленной на соискание
ученой степени кандидата биологических наук по специальности
03.03.04 – «Клеточная биология, цитология, гистология».

Актуальность исследования

Изучение фундаментальных и прикладных механизмов становления и развития стволовых клеток (СК) является магистральным направлением современной биологии развития и молекулярной медицины. Известно, что тотипотентные СК дробящейся зиготы млекопитающих дают начало всему организму и в определенном количестве сохраняются во всех его тканях.

Среди различных типов СК пристальное внимание привлекают мезенхимные стволовые клетки (МСК), получаемые из косного мозга, жировой ткани или пуповинной крови плода. Именно эти клетки, благодаря своей доступности и способности к неограниченному росту и дифференцировке являются не только излюбленным объектом научных исследований, но все чаще находят практическое применение в клинике.

Сравнительно недавно описан новый тип МСК, который получают из эндометрия (эМСК). Доступность, возможность неинвазивного метода получения, высокая пролиферативная активность и мультипотентность

эмСК ставят их в один ряд с другими более изученными типами СК. Практическое применение эмСК требует их выращивания в условиях длительного культивирования, что сопряжено с накоплением генетических изменений и возможности бласттрансформации. Проблема возможной спонтанной трансформации МСК чрезвычайно актуальна, поскольку касается онкологической и генетической безопасности трансплантируемого материала. Не менее важным является вопрос, сохраняют ли эмСК свою функциональную стабильность при длительном культивировании, то есть способность дифференцироваться в клетки других тканей в адипогенные, хондрогенные и остеогенные и в какой мере. Их генетические и функциональные особенности зависят от индивидуальных генетических особенностей донора, в частности, от наличия наследственных и мультифакторных заболеваний (МФЗ). Поэтому выбор соискателем в качестве объектов сравнения эмСК от здоровых доноров и от больных аденомиозом (АМ) представляется логичной находкой, усиливающей и без того большую актуальность проведенного исследования.

Таким образом, изучение физиологических и генетической особенностей эмСК от разных доноров, возможности спонтанной трансформации эмСК в системе *in vitro* при культивировании в стандартных условиях и в условиях термошока существенно для выяснения фундаментальных цитологических механизмов становления и дифференцировки СК и имеет решающее значение для оценки возможности использования эмСК для клеточной терапии.

Новизна исследования

В комплексных исследованиях эмСК с использованием цитологических, иммуногистохимических и молекулярно-генетических методов исследования, G-бэндирувания и молекулярного кариотипирования в диссертационной работе Шелиной М.А. впервые изучены характеристики

эмСК, полученных от нормальных здоровых доноров и от больного с АМ, которые показали принципиальное сходство этих клеток по всем изученным свойствам: типу роста, мультипотентному статусу, экспрессии поверхностных маркеров, пролиферативной активности. Вместе с тем, они показали повышенную нестабильность кариотипа эмСК у больных с АМ в отношении перестроек хромосом 7 и 11. Кариотипическая нестабильность в меньшей степени и по другим хромосомам была характерна и для эмСК от здоровых доноров, которая существенно возрастала после сублетального теплового шока. Принципиально важной находкой соискателя является то, что кариотипическая нестабильность эмСК, индуцированная ТШ, не сопровождается микрохромосомными нарушениями и что эти клетки при длительном культивировании вступают в фазу репликативного старения, но не подвергаются иммортализации/трансформации.

Научно-практическая значимость работы

Соискателем продемонстрирована простота и надежность неинвазивного способа получения эмСК, изучены особенности их пролиферации и мультипотентности, показана возможность использования для клеточной терапии. Принципиально важным является доказательство того, что в процессе длительного культивирования не происходит спонтанной трансформации эмСК, что открывает возможности их применения при разработке подходов клеточной терапии и для решения задач регенеративной медицины. эмСК представляют интерес для биологии развития как естественные модели для исследования механизмов пролиферации, дифференцировки и межклеточных взаимодействий СК взрослого организма.

Общая характеристика работы

Диссертация изложена 118 страницах, построена по традиционному плану, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов,

результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, включающего 205 источников. Иллюстративный материал включает 42 рисунка и 2 таблицы.

Во **Введении** (16 стр.) кратко и информативно обосновывается актуальность темы диссертационной работы, её основные цели и задачи, приведены наиболее значимые результаты и положения, выносимые на защиту, научная новизна и практическая значимость работы, список публикаций по теме диссертации, включающий 5 работ из списка ВАК, тезисов научных конференций (всего 15), на которых были представлены результаты исследований.

Обзор изложен на 27 стр., состоит из 12 подразделов, в которых профессионально грамотно излагаются материалы истории стволовых клеток (СК), их классификация, источники получения и особенности плюрипотентности СК разного происхождения, специально рассмотрены антигенные и пролиферативные характеристики мезенхимных СК (МСК) разного генеза и СК эндометриального происхождения (эМСК). Специальные разделы обзора посвящены существующим в литературе представлениям об имморатлизации и бласттрансформации эМСК, их генетической стабильности при культивировании *in vitro*, влиянию гипертермии и теплового стресса на репарацию ДНК в эМСК. Кратко рассмотрены клинические и цитологические характеристики патологического развития клеток эндометрия, следствием которого являются такие частые хронические заболевания у женщин как эндометриоз и аденомиоз(АМ).

В разделе **Материал и методы** (7стр.) дано описание способа получения эМСК, 5 из которых были получены от нормальных здоровых женщин и 1 от женщины больной АМ. Дано описание морфологии эМСК, методов изучения их иммунофенотипирования, пролиферативной активности и анализа клеточного цикла, методы доказательства

плюрипотентности изучаемых культур эмСК, кратко рассмотрены технологии их криоконсервации, способы гипертермии и проведения теплового шока. Специальные разделы посвящены примененным в работе специальным методам исследования: хромосомный анализ, молекулярное кариотипирование, транскриптомный анализ и цитохимический метод для анализа старения культивируемых клеток.

В главе **Результаты** дано подробное описание всех вариантов проведенных экспериментов и полученных результатов. В частности, характеристики использованных в работе линий эмСК, результаты цитометрического и гистохимического фенотипирования, анализа их мультипотентного статуса, экспрессии соответствующих тканеспецифичных мембранных антигенов, различных вариантов кариотипического анализа (стандартная окраска G-дисков хромосом, молекулярное кариотипирование). Подробно рассмотрены эксперименты по изучению особенностей пролиферации эмСК, их старения с увеличением числа пассажей, эффекты перегревания или ТШ. Специальные разделы главы посвящены исследованию этих же характеристик в эмСК от больных АМ.

Обобщение полученных результатов и их критический анализ в сравнении с известными данными сделаны в разделе **Обсуждение**. Несмотря на небольшой объем (9 стр.) раздел не оставляет сомнения в научной зрелости соискателя, её безусловных способностях не только как тщательного экспериментатора, но вполне зрелого научного работника.

Диссертационное исследование оформлено тщательно, написано грамотным русским языком с очень небольшим числом опечаток. Явных ошибок и просчетов не отмечается. Хотелось бы, однако, спросить мнение соискателя по нескольким вопросам

1. В какой мере полученные результаты могут быть использованы для понимания механизмов трансформации клеток эндометрия в эндометриоидные клетки?

2. Отмечается ли повышенная способность к трансформации ЭМСК?

3. Что дает выполненное исследование для понимания патогенеза эндометриоза и аденомиоза?

Все результаты выполненной диссертационной работы получены на вполне репрезентативном материале с использованием адекватных инструментальных и статистических методов анализа, что и предопределило несомненную новизну, большую научную и практическую значимость полученных данных.

Результаты работы хорошо отражены в 5 полноценных научных статьях высокого научного рейтинга и представлены на многочисленных (15) научных конференциях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В целом диссертационная работа М.А.Шилиной безусловно актуальна, выполнена на высоком уровне, полученные результаты имеют большую научную и потенциальную практическую значимость. Цель, задачи и положения, вынесенные на защиту, полностью выполнены.

Диссертационная работа Марии Александровны Шилиной «Физиологическая и генетическая характеристика эндометриальных мезенхимных стволовых клеток человека», выполненная под руководством доктора биологических наук, академика РАН Николая Николаевича Никольского, представляет собой законченное исследование, является научной квалификационной работой, содержит принципиально новую информацию о морфологических, функциональных и генетических свойствах как нормальных, так и патологических мезенхимных клетках эндометрия. Диссертация соответствует требованиям пп.9-14 «Положения

о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. N 842 (в редакции Постановления Правительства РФ от 21.04.2016 г. №335, от 02.08.2016 г. №748), предъявляемым к кандидатским диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор Шилина М.А. заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология.

Отзыв обсужден и утвержден на заседании совместного семинара лаборатории пренатальной диагностики врожденных и наследственных заболеваний, лаборатории иммунологии и отдела патоморфологии ФГБНУ «НИИАГиР им. Д.О. Отта» 11 мая 2017 г., протокол № 15.

Заведующий лабораторией пренатальной диагностики
врожденных и наследственных болезней
Федерального государственного бюджетного научного учреждения
«Научно-исследовательский институт акушерства,
гинекологии и репродуктологии имени Д.О.Отта»
доктор медицинских наук, профессор,
член-корреспондент РАН, заслуженный деятель науки РФ,
199034, г. Санкт-Петербург, Менделеевская линия, д. 3
тел. +7(812)328 04 87
e-mail: baranov@vb2475.spb.edu

Баранов Владислав Сергеевич

Подпись Владислава Сергеевича Баранова заверяю:

Ученый секретарь ФГБНУ "НИИАГиР им. Д.О.Отта"
д.м.н., чл.-корр.РАН, проф.



И.Ю.Коган

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и

репродуктологии имени Д.О. Отта» (ФГБНУ «НИИ им. Д.О.Отта)

Адрес: 199034, г.Санкт-Петербург, Менделеевская линия, д.3

Тел.: +7(812)328-14-03

Факс: +7(812)328-23-61

e-mail: iagmail@ott.ru

Сайт организации: www.ott.ru