

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических наук Примак Александры Леонидовны на тему: «Создание культуры иммортализованных мультипотентных мезенхимных стромальных клеток человека для задач регенеративной биомедицины» по специальности 1.1.10. Биомеханика и биоинженерия

Актуальность темы исследования

Регенеративная медицина, как отрасль медицинской науки, имеющая очень хорошие перспективы для развития как фундаментальных основ биомедицины, так, возможно, и для клиники, является относительно новой дисциплиной. Надо признать, что ее мировые основы заложил выдающийся российский гистолог-эмбриолог Александр Александрович Максимов еще в 19 веке, в самом начале 20 века введя термин «стволовые клетки» на основе изучения развития элементом крови.

Хотя есть достаточно серьезные разночтения, что считать стволовой клеткой и какими характеристиками она обладает, и, прежде всего, какие индикаторные гены можно считать признаками стволовости, есть ряд функциональных характеристик, на основании которых имеется почти полный консенсус признания тех или иных клеток стволовыми или прогенитарными. Эти клетки исходно считаются недифференцированными, и они в результате определенных воздействий могут дифференцироваться в целый ряд клеточных фенотипов, в зависимости от окружения и физиологических требований, прежде всего, вызванных утратой соматических клеток. Эта утрата, в частности, является естественным результатом физиологической деятельности, в ходе которой клетки снижают свои функциональные характеристики до тех значений, которые определяют необходимость их устранения через программу аутофагии.

С другой стороны, в результате резких изменений со стороны внешней среды, в сочетании с малым сопротивлением организма-хозяина или в

результате патологических процессов, развивающихся в организме, происходит программируемая или резкая непрограммируемая гибель клеток, которая несет угрозу жизнедеятельности организма. Хотя у организма есть некоторый резерв, который определяется заведомой избыточностью клеточности, массовая гибель опасна. В частности, гибель опасна не только за счет того, что приписываемая данному типу клеток функция выполняется не в должной мере, но и тем, что продукты гибнущих клеток несут ряд негативных сигналов, которые могут инициировать процесс воспаления разной мощности от той, которая защищает, до той, которая губит.

Естественным ответом организма на утрату части клеток является мобилизация пролиферативных процессов. Однако, особую угрозу для организма несет утрата тех клеток, пролиферативный потенциал которых низок или отсутствует, а именно пост-митотических клеток, таких как нейроны или кардиомиоциты. В таком случае, для возмещения клеточности запускается пролиферация тех клеток, у которых процесс деления является нормальным и достаточно частым, в частности фибробластов. Последние, конечно же могут заполнять пораженный объем органа, но результат этот нельзя считать полностью положительным, ибо образуется рубцовая ткань, резко меняющая функциональность органа, что очень плохо для всего организма.

Видимо, в качестве еще одной линии защиты от повреждения и восполнения утраты клеток, есть мобилизация пула клеток, которые могут быть в каждом органе, но не относящихся к соматическим и запускающим пролиферацию в направлении фенотипа клеток, которые были утрачены. Это очень важный, хотя и не очень массивный и не быстрый процесс, который очень хотелось бы сделать основным, но, к сожалению, пул этих клеток не велик, да и в самом пуле происходят временные изменения, уменьшающие качество клеток. Естественно, это побуждает к вмешательству со стороны медиков с целью введения экзогенных клеток или равноценных компонентов в пораженный организм, что требует массовой продукции этих биологических

структур. Таким образом, любой подход для обеспечения массовой генерации клеток, способных обеспечить репарацию поврежденного органа, является максимально актуальным.

Степень обоснованности положений, выносимых на защиту, научных выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, их достоверность и новизна.

Положения, выносимые на защиту, являются полностью достоверными и обоснованными. В основе работы лежит вывод, что после трансдукции мезенхимальных стромальных клеток (МСК) из жировой ткани лентивирусным вектором, содержащим последовательность, кодирующую каталитическую субъединицу теломеразы hTERT, эти клетки приобретают свойства повышенной и может быть неограниченной пролиферации, со сохранением во времени и длительной неизменностью длины теломеры, и этот вывод является полностью доказанным. Кроме этого, для таких модифицированных клеток не отмечено появление во времени признаков старения, что, без сомнения, является признаком однозначной новизны, ибо за этот принцип борется великое множество исследователей. Важным и принципиальным моментом является доказательство неизменности кариотипа, что говорит о невмешательстве использованной методологии в этот фактор, что дает основу для перспективы по безопасности и рекомендациям для будущих клинических применений. Эти рекомендации могут быть равнозначными для любого источника как МСК (костно-мозговых, жировых или пуповинных), так и, возможно их продуктов в виде компонентов МСК, включая экстраклеточные везикулы, что сулит хорошее будущее для этого типа исследований. Достаточно уникальными стали полученные данные по чувствительности таких модифицированных МСК к гормональным воздействиям, что расширяет возможности дальнейшего изучения и будущих модификаций подхода по изменению свойств МСК.

Характеристика структуры и содержания диссертации, замечания

Диссертация оформлена должным и традиционным образом и не вызывает больших нареканий. Иллюстрации соответствуют российскому и международному стандарту с указанием на графиках необходимой статистики, на основании которой делаются заключения.

Хотя существует множество направлений исследований, нацеленных на тот же результат, который и преследовала диссертант, причем используя близкие методические приемы, автор в полном праве претендует на новизну не самого методического подхода, который, на самом деле стартовал в 2002 году, а на его расширение на целый ряд вытекающих из данного метода новых подходов, основным из которых, конечно же, является содержание и качество секретома. Однако, надо заметить, что в таком плане очевидность описания новизны у автора выглядела не сильно, хотя она и очень заметна в том, контексте, который я указал выше. Учитывая увеличивающийся интерес к секретому стволовых клеток, надо отметить, что в этой работе достойно охарактеризован секретом как в плане частных элементов, входящих в состав, так и в плане его биологического действия, как ускорителя роста нейритов и антифиброзного агента.

Совершенно очевидная новизна и важный момент диссертационной работы были в направленном создании перевиваемой и практически бессмертной линии стволовых клеток, которые были чувствительны к разным сигнальным молекулам, что особенно важно к инсулину, что дало неоспоримое преимущество перед другими клеточными линиями, в частности коммерческими, у которых эта чувствительность не наблюдалась. Это резко меняет спектр применимости этих клеток, и опять же жалко, что это прозвучало в диссертации не слишком сильно, хотя и заслуживало специального и многократного описательного повторения этого момента.

Диссертант работала с тремя разными клетками, взятыми от двух молодых и одного зрелого возраста донора и подвернутых трансфекции hTERT и проводила сравнение с коммерческой культурой. Было показано, что

от пассажа к пассажи у клеток в основном сохраняется длина теломеры, хотя активность теломеразы меняется достаточно интересным способом, что может дать основу для анализа о связи возраста донора, активности теломеразы, длины теломеры, уровня пролиферации и, возможно, активности ДНК полимеразы. Жалко, что исчерпывающий анализ по ассоциации этих параметров не был проведен, ограниваясь и довольствуясь лишь данными, что в результате трансфекции hTERT сохраняется длина теломеры даже после длительного пассирования, что конечно же очень важно и входит в ряд целей этой работы, однако из этих данных можно экстрагировать важную ассоциативную информацию.

Автору удается осуществить соответствующую успешную дифференцировку для одного типа клеток, исходно взятых из молодого донора и в некоторой мере у донора зрелого возраста (возможно находящейся в постменопаузной стадии, что, к сожалению, не указано).

Очень важным результатом явилось доказательство, что трансфекция не поменяла кариотип клеток, что является критическим аргументом в пользу того, что клеточная трансформация не имеет место. В противном случае эта культура не имела бы перспектив для клинического применения.

С другой стороны, такая трансфекция в результате дает высокий уровень пролиферации стволовых клеток, что является, несомненно, большим методическим успехом, хотя и в будущем потребует дальнейших усилий по всем возможным доказательствам отсутствия канцерогенности тератогенности и пр.

Заключение

Диссертационная работа Примака Александры Леонидовны представляет собой зрелое исследование, проведенное на достойном методическом и интеллектуальном уровне, вносящее весомый вклад в фундаментальные знания биомедицины и имеющее перспективу для практического использования. Все полученные данные имеют достоверный характер,

находящийся в контексте поставленных целей работы, которую можно считать завершенной на данном этапе.

Указанные мною не очень многочисленные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Содержание автореферата полностью отражает основное содержание диссертации. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 1.1.10. Биомеханика и биоинженерия (по биологическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова. Диссертационное исследование оформлено согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Примак Александра Леонидовна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.1.10. Биомеханика и биоинженерия.

Официальный оппонент:

Заведующий отделом функциональной биохимии биополимеров НИИ физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», член-корреспондент РАН, действительный член Европейской Академии, профессор

Зоров Дмитрий Борисович



11.06.2026

Контактные данные:

тел. 7(968)4754629 e-mail: zorov@belozersky.msu.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация:

