

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертацию Юлии Сергеевны Ивановой «Внутриклеточный уровень активных форм кислорода и его изменение в пролиферативном цикле плюрипотентных стволовых клеток человека», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.22. - «Клеточная биология».

Актуальность темы исследования

Диссертационная работа Юлии Сергеевны Ивановой посвящена изучению особенностей редокс-гомеостаза и редокс-регуляции пролиферативного цикла в культурах плюрипотентных стволовых клеток (ПСК) человека. К настоящему моменту стало очевидно, что внутриклеточные активные формы кислорода (АФК) играют важную регуляторную и сигнальную роль в самых разных внутриклеточных процессах от метаболизма до пролиферации, и лишь их избыточная патологическая продукция вызывает негативные последствия от окислительного стресса до гибели клетки. Помимо довольно хорошо описанного участия АФК в регуляции иммунных реакций организма и апоптоза недавно было показано, что эти медиаторы задействованы в сигнализации связанной с пролиферацией и дифференцировкой клеток, в том числе стволовых. Плюрипотентные клетки, исследованные в данной работе, это уникальный тип стволовых клеток, характеризующийся способностью к дифференцировке во все клеточные типы трёх зародышевых листков и неограниченным пролиферативным потенциалом. Способность ПСК к самообновлению является необходимым условием формирования всех тканей организма на стадии эмбриогенеза, однако количество исследований, посвященных особенностям редокс-регуляции клеточного цикла ПСК, пока крайне ограничено, а полученные данные - противоречивы. В связи с этим, актуальность сравнительной оценки внутриклеточного уровня АФК в разных фазах клеточного цикла в культурах ПСК и их дифференцированных клеток-потомков, а также определение физиологического значения вариации уровня АФК на протяжении пролиферативного цикла ПСК, не вызывает сомнений. Полученные результаты имеют как фундаментальное значение для понимания биологии стволовых клеток, так и прикладное для биомедицинских технологий, использующих ПСК для моделирования и терапии различных заболеваний человека.

Научная новизна, достоверность и значимость результатов

Диссертационная работа выглядит хорошо спланированным и грамотно выполненным научным исследованием. Полученные результаты являются приоритетными и достоверными, а их обработка проведена с использованием адекватных статистических методов. Представляемые к защите научные положения обоснованы. Выводы сформулированы четко, ясно и соответствуют поставленным задачам.

По теме диссертации автором опубликовано 11 печатных работ: 6 научных статей в журналах, индексируемых в базах Scopus и Web of Science (все 6 – в журналах первого квартриля), а также 5 работ в сборниках трудов конференций. Результаты работы апробированы на 2 международных и 4 российских научных конференциях. Исследования проводились при поддержке грантами РФФИ и РНФ.

Структура и содержание диссертации

Диссертация Ю.С. Ивановой изложена на 125 страницах и построена по традиционному плану: состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов,

результатов исследования, их обсуждения, выводов и списка литературы, содержащего 137 ссылок на первоисточники. Результаты диссертации полно и наглядно отражены на 18 рисунках.

В введении автор аргументирует актуальность выбранной темы и формулирует цель и задачи исследования, а также основные положения, выносимые на защиту. В данном разделе отражена научная новизна, фундаментальная и практическая значимость диссертации, а также отмечен определяющий вклад диссертанта в получение результатов работы.

В диссертации последовательно и логично выстроен обзор литературы, где приводится общая характеристика плюрипотентных клеток, детально описываются как общие закономерности регуляции пролиферативного цикла в соматических клетках, так и специфика регуляции цикла именно у ПСК. Подробно, со ссылками на недавно опубликованные исследования, обсуждаются внутриклеточные источники генерации и элиминации АФК, особенности редокс-гомеостаза ПСК, а также роль АФК в сигнальных каскадах, регулирующих клеточную пролиферацию. Отдельный интерес представляет раздел, посвященный биоэнергетике стволовых клеток, в котором приводятся данные о становлении этого раздела биологии стволовых клеток, в том числе, некоторые ошибочные суждения, впоследствии опровергнутые. Автор демонстрирует глубокое понимание фундаментальных аспектов научной области, которой относится диссертационная работа, что позволяет ему логично формулировать задачи экспериментального исследования.

В главе «Материалы и методы» описываются использованные в ходе выполнения работы экспериментальные методики. Спектр применяемых автором методов молекулярной и клеточной биологии обеспечивает высокое научное качество работы. Особенно следует отметить использование техники клеточного репрограммирования для получения линии индуцированных плюрипотентных клеток человека. Настоящая диссертация выполнена на высоком методическом уровне, а использованные методы адекватны поставленным задачам.

К основным полученным в работе результатам можно отнести то, что интенсивность флуоресценции АФК-чувствительного зонда дихлордигидрофлуоресцеин диацетата при оценке с помощью проточной цитометрии зависит от размера клеток, что вносит значительную погрешность в оценке уровня продукции АФК в клетках разного типа. Соответственно, установлено, что наблюдаемые различия между внутриклеточным уровнем АФК в культивируемых ПСК и их дифференцированных клетках-потомках, в большем определяются разницей в геометрических размерах клеток. Вместе с тем, в работе впервые показано, что относительный уровень АФК, определяемая по интенсивности флуоресценции DCF, нормированной на единицу объема клетки, практически одинаков в ПСК и их дифференцированных клетках-потомках. Кроме того, продемонстрировано, что кажущиеся изменения уровня АФК в клеточном цикле ПСК человека также связаны с изменением клеточного размера, а в целом обеспечивается постоянство определенной физиологической внутриклеточной концентрации АФК на протяжении цикла. Показано, что снижение концентрации АФК в ПСК человека под действием антиоксидантов приводит к нарушению регуляции S-фазы клеточного цикла, влекущему накопление двунитевых разрывов ДНК и индукции апоптоза в этих клетках. Несомненным достоинством работы является проведение исследований с использованием нескольких клеточных культур – трёх линий ПСК человека (двух линий эмбриональных стволовых клеток и одной, полученной автором работы, линии индуцированных ПСК), а также двух

культур дифференцированных клеток (клеток-предшественников и клеток, дифференцированных из ПСК). Таким образом, в диссертационном исследовании выявлены как универсальные механизмы редокс-регуляции клеточного цикла разных клеток, так как особенности редокс-гомеостаза ПСК человека.

Обсуждение результатов, содержащееся в отдельной главе диссертации, проведено всесторонне с привлечением актуальных данных от мировых научных групп, занимающихся аналогичными проблемами. Автор четко позиционирует полученные в работе результаты, вписывая их в контекст современных представлений о редокс-биологии ПСК, и обсуждает перспективы дальнейших исследований в этой области науки.

В заключительном разделе работы, автор формулирует выводы, которые вытекают из полученных результатов и других материалов диссертации.

К общим достоинствам диссертационной работы следует отнести широкий спектр использованных методов и большой спектр использованных клеточных линий, что позволяет говорить, как об универсальности каких-то механизмов, так и о имеющихся различиях, зависящих от типа или происхождения клеток.

При общей высокой оценке диссертационной работы Ю.С. Ивановой, у оппонента возникли следующие замечания и рекомендации:

1. Сложно полностью согласиться с терминологическими определениями уровня АФК и концентрации АФК, которыми оперирует автор, опираясь на интенсивность флуоресценции зонда H2DCFDA. Поскольку данный зонд не дает возможности прямо определять количество или концентрацию АФК, выраженное в молях/л, например, то разница между уровнем, содержанием и концентрацией АФК становится очень условной, поскольку во всех случаях автор оперирует относительными единицами. По моему мнению, стоит апеллировать к более традиционно используемым понятиям интенсивности флуоресценции данного зонда, которые хоть и непосредственно коррелированы с концентрацией АФК (причем до конца не известно, какой именно из АФК), но не могут быть напрямую переведены в единицы концентрации или количества вещества.
2. Поскольку авторы показали значительную зависимость результатов оценки интенсивности флуоресценции DCF от размера клеток, то было бы очень желательно представлять ко всем данным проточной цитометрии точечные диаграммы (дот-плоты) распределения клеток по размерам (в координатах SSC/FSC). Это бы помогло оценить изменение размеров клеток, поскольку различные воздействия на клетки или изменение фазы клеточного цикла могут сопровождаться изменением объема клеток
3. Задачу «Получить и охарактеризовать линию индуцированных плорипотентных стволовых клеток человека (чиПСК)» стоило бы конкретизировать и расширить, поскольку как таковое получение иПСК из довольно широкого спектра клеток на сегодняшнем этапе развития технологий является довольно тривиальной методической задачей.

Вместе с тем, указанные замечания не являются критическими и не умаляют значимости диссертационного исследования.

Можно заключить, что диссертация Юлии Сергеевны Ивановой «Внутриклеточный уровень активных форм кислорода и его изменение в пролиферативном цикле

плюрипотентных стволовых клеток человека» является законченным исследованием, а научная квалификация соискателя не вызывает сомнений.

По актуальности проблемы, объему представленного материала и новизне полученных результатов диссертационная работа Ю.С. Ивановой, удовлетворяет всем требованиям п.п 9 – 14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 (в редакции от 11.09.2021), предъявляемым к диссертациям, представленным на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор, Иванова Юлия Сергеевна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.22. - «Клеточная биология».

д. б. н., заведующий лабораторией структуры
и функции митохондрий Научно-исследовательского
института физико-химической биологии имени
А.Н. Белозерского Федерального государственного
бюджетного образовательного учреждения
высшего образования «Московский государственный
университет имени М. В. Ломоносова»



Плотников Е.Ю.

119992 Москва, ГСП-1,
Ленинские горы, д.1, стр.73
Тел.: 8-916-554-23-39
E-mail: plotnikov@belozersky.msu.ru

Подпись д.б.н. Плотникова Е.Ю.

«Удостоверяю»

Зав.канцелярией НИИ ФХБ имени А.Н.Белозерского



Н.Н.Сидорова

«23» ноября 2022г.

МП

