

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ

**ИНСТИТУТ
ЦИТОЛОГИИ И ГЕНЕТИКИ**
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
(ИЦиГ СО РАН)

Просп. Академика Лаврентьева, д. 10, Новосибирск, 630090
Телефон: (383) 363-49-80
Факс (383) 333-12-78
E-mail: icg-adm@bionet.nsc.ru
http://www.bionet.nsc.ru
ИНН 5408100138/КПП 540801001
ОКПО 03533895 ОГРН 1025403657410

УТВЕРЖДАЮ

Директор Института цитологии и генетики
СОРАН

академик Н.А.Колчанов

14 января 2015 г



14.01.2015 № 15345-45-2171

На № _____ от _____

ОТЗЫВ

ведущей организации – Института цитологии и генетики СО РАН – на диссертационную работу Гордеевой Ольги Федоровны «Закономерности нормального и патологического развития плюрипотентных стволовых и тератокарциномных клеток млекопитающих», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология.

Диссертационная работа О.Ф.Гордеевой посвящена сравнительному изучению свойств эмбриональных и генеративных (первичных половых) стволовых и тератокарциномных клеток как в отношении их ключевой характеристики, каковой является плюрипотентность, так и приобретения ими свойств опухолевых клеток под влиянием внешних факторов (длительное культивирование *in vitro*) и/или внутренних - эффектов мутаций и эпигенетических геномных событий. Учитывая, что исследования эмбриональных стволовых клеток (ЭСК), эмбриональные генеративные клетки (ЭГК) и сходных по свойствам индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) находятся в майнстриме современной молекулярной и клеточной биологии, данное исследование можно уверенно отнести к категории фундаментальных, поскольку направлено на исследование природы плюрипотентности, одного из самых сложных явлений в биологии развития.

Актуальность темы. Появление технологий длительного культивирования *in vitro* клеток пред-имплантационных эмбрионов (главным образом со стадии бластоцисты) открыло новые возможности изучения фундаментальных свойств эмбриональных клеток, таких как плюрипотентность и пусковые молекулярные механизмы ранних стадий дифференцировки. Учитывая, что даже после длительного культивирования донорские эмбриональные клетки сохраняют уровень плюрипотентности сходный с нативными клетками эмбриона, что

показано прямыми экспериментами по инъекции культивируемых клеток в бластоцисты. Инъецированные клетки колонизируют реципиентную бластоцисту и развиваются химерное животное, способное генерировать два типа гамет, с генотипом реципиентного эмбриона и инъецированных клеток. Культивируемые эмбриональные клетки бластоцист получили название ЭСК.

Накопленный экспериментальный материал, главным образом, на мыши и человеке, показал, что имеются существенные видовые различия в плюрипотентности между ЭСК человека и мыши. Главным источником ЭСК мыши являются клетки внутренней массы (ВКМ), тогда ЭСК человека могут быть как клетки эпибласта, так и ВКМ. Уровень плюрипотентности разный у ВКМ и клеток эпибласта, для этого введены термины *naïve state* для ВКМ и *primed* для эпибласта. Эти уровни плюрипотентности различаются по способности или неспособности давать начало развитию гамет, первые могут, тогда как вторые нет.

Безусловно, актуальным представляется нацеленность О.Ф.Гордеевой разобраться в этих категориях плюрипотентности в ЭСК и молекулярных механизмах ее поддержания. Кроме того, выяснить каким образом достигается баланс пролиферации и дифференцировки ЭСК, ЭГК и ИПСК. Отдельной большой проблемой представляется онкогенная трансформация и факторы, ей способствующие в ЭСК, ЭГК и ИПСК в сравнении с тератокарциномными клетками.

В представленной работе присутствует и прикладной аспект, поскольку анализируются явления самообновления и пролиферации свойственные ЭСК и ИПСК и приобретением этими клетками неконтролируемого роста и пролиферации, что крайне актуально, если иметь в виду потенциальное использование ЭСК и ИПСК в практической медицине в будущем.

Автором сформулированы в общем виде цели исследования как направленные на поиск закономерностей взаимосвязи механизмов самообновления, так и закономерностей дифференцировки ЭСК, ЭГК и тератокарциномных клеток человека и мыши. Конкретные задачи исследования включают: анализ экспрессии маркерных генов специфичных для гамет в дифференцирующихся плюрипотентных стволовых клеток, на основании чего определить статус их плюрипотентности, поиск различий в функционировании сигнальных путей обеспечивающих пролиферацию и дифференцировку в нормальных плюрипотентных стволовых и тератокарциномных клетках, сравнить экспрессию рако-тестикулярных

антигенов семейства MAGE-A, MAGE-B, MAGE-D и GA в плюрипотентных стволовых и опухолевых клетках и оценить возможность их использования в качестве маркеров. Две задачи направлены на оценку *in vivo* потенциала плюрипотентных стволовых и опухолевых клеток человека и мыши с целью разработки стандарта тестирования онкогенного потенциала и создание тест-системы оценки эмбриотоксичности тестируемых препаратов, используя плюрипотентные стволовые клетки.

Научная новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.

В работе получен ряд интересных оригинальных результатов. Так, например, статусы naïve и primed ЭСК мыши и человека можно идентифицировать по присутствию маркера(ов) специфичных для раннего гаметогенеза, например, *Ddx4/DDX4*. Тестирование 3-х новых линий ЭСК человека показало, надежность такой маркировки.

Впервые установлено, что ЭСК человека и мыши имеют сходные профили экспрессии раково-тестикулярных антигенов семейств MAGE-A, MAGE-B и MAGE-D. На основе детального сравнительного изучения экспрессии этих антигенов в ЭСК и опухолевых клетках был сделан вывод, что трансформированные клетки в культуре ЭСК могут быть надежно выявлены по появлению антигенной сигнатуры свойственной опухолевым клеткам.

Автором впервые установлено, что механизмы сигнальной регуляции самообновления и дифференцировки клеток в плюрипотентных статусах naïve и primed значительно различаются благодаря различиям в уровнях экспрессии факторов *TGFβ1*, *BMP4*, *ActivinA* и *FGF2*. Впервые показано, что потенциал к дифференцировке у плюрипотентных стволовых и нуллипотентных тератокарциномных клеток мыши и человека обусловлен различными уровнями экспрессии факторов семейства $TGF\beta$ на фоне усиления активности PI3K/Akt и MEK/ERK сигнальных путей.

Автором предложена технология оценки эмбриотоксичности соединений в процессе роста и дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток в 3D-системах *in vitro*, по их эффекту на динамику дифференцировки и морфогенеза эмбрионидных телец.

Значимость полученных соискателем результатов для науки и практической деятельности.

Выше отмечалось теоретическое и научное значение полученных новых данных для понимания природы плюрипотентности, роли сигнальных систем в определении статуса плюрипотентности и вовлеченность раково-тестикулярных антигенов семейств MAGE-A, MAGE-B и MAGE-D в трансформацию нормальных плюрипотентных клеток в опухолевые тератокарциномного типа. Это новые интересные и важные данные для клеточной биологии и понимания раннего развития млекопитающих.

Что касается практической значимости полученных данных, следует отметить несомненную полезность изучения транскрипционных профилей генов, специфических для половых клеток, и раково-тестикулярных антигенов для стандартизации ЭСК и ИПСК перспективных для применения в регенеративной медицине. Кроме того, исследование профиля экспрессии раково-тестикулярных антигенов несомненно целесообразно для скрининга культивируемых ЭСК и ИПСК человека для идентификации аномальных (опухолевых) клеток, что должно повысить безопасность применения клеточных технологий в практической медицине.

Можно с уверенностью утверждать, что предлагаемая автором технология оценки эмбриотоксичности соединений в культурах ЭСК и ИПСК человека в 3D- системах *in vitro* имеет хорошие перспективы для практического применения при тестировании фармакологических и токсикологических исследований новых лекарств.

Структура и содержание работы.

Диссертационная работа О.Ф.Гордеевой изложена на 275страницах, содержит 68 рисунков, 8 схем, 7 таблиц и состоит из следующих разделов: введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов, обсуждения, выводов и списка литературы, включающего 573 цитируемых источника.

Раздел «Обзор литературы» представлена 6 главами и изложена на 43 стр. В нем отражены данные последнего десятилетия, этой наиболее бурно развивающейся области современной биологии. Свойства нормальных плюрипотетных клеток и плюрипотентных опухолевых аналогов достаточно детально и всесторонне рассмотрены важнейшие характеристики как самообновление, механизмы поддержания плюрипотентности, генетическая и эпигенетическая стабильность, взаимоотношения процессов дифференцировки и регуляции плюрипотентности. Отдельной главой изложены данные по тератокарциномным клеткам. Следует сказать, что последний аспект слабо освещается в отечественной и зарубежной литературе. Общее впечатление от обзора позитивное, хорошо видно, что автор в

курсе современных тенденций в исследованиях плюрипотентных стволовых клеток человека, мыши и других видов млекопитающих. Систематизированный литературный материал дает полное представление об основных направлениях исследований в этой области.

Раздел «Материал и методика» изложен на 15 страницах, где подробно описаны линии исследованных клеток. Сам список линий впечатляет: 2 линии ЭСК мыши, 6 линий ЭСК человека, 2 линии ЭГК мыши, 2 линии тератокарцином мыши и одна человека и 10 линий опухолевых клеток человека и мыши. Подробно описаны способы культивирования перечисленных выше линий клеток. Следует отметить, что технология культивирования ЭСК и ЭГК имеет свои особенности и, в целом, трудоемки. Так же подробно описаны специфические приемы оценки плюрипотентности методами клеточной биологии, такие как получение эмбрионидных телец, дифференцировка тератокарциномных клеток в монослое. Детально изложены методы получения опухолей у иммунодефицитных мышей из нормальных и опухолевых плюрипотентных стволовых клеток с последующим гистологическим анализом тератом.

Основным методами оценки экспрессии генов были количественный метод ПЦР в реальном времени и полуколичественный ОТ-ПЦР. В работе широко представлены иммуногистохимические методы маркерных белков специфических для той или иной стадии развития или дифференцировки плюрипотентных клеток.

Результаты.

Раздел «Результаты» содержит 33 страницы, в которых описаны полученные данные изложенные в 5 главах. Фактически каждая глава соответствует одной из 5-ти поставленных задач. В Главе 1 приведены данные указывающие на различия в экспрессии генов маркирующих раннее развитие и гаметогенез в ЭСК, ЭГК мыши и ЭСК человека. Мышиные ЭСК и ЭГК, как правило, позитивны по *Vasa/Ddx4/DDX4*, хотя уровень экспрессии ниже, чем в эмбриональных эндогенных гонocyтах, тогда как в ЭСК человека экспрессия либо нулевая или следовая. На основании этих данных автор делает вывод, что статус ЭСК мыши соответствует naïve, а ЭСК человека primed. Отмечено также межлинейная вариабельность в экспрессии генов-маркеров гаметогенеза. В главе 2 приведены данные по изучению экспрессии раково-тестикулярных антигенов (РТА) в плюрипотентных стволовых и опухолевых клетках различного происхождения. При анализе ЭСК человека было обнаружено присутствие РТА семейства MAGE-A, D и GAGE. Однако отмечены межлинейные различия, например, в линиях ЭСК человека SC5 и SC7, была обнаружена

экспрессия *MAGE-A3*, *A6*, *A4*, *A8* и *GAGE*, а в SC3а экспрессировались *MAGE-A3*, *A6*, *A8* и *GAGE*, но не экспрессировался ген *MAGEA4*. Интересно, что экспрессия РТА при дифференцировке ЭСК человека сопровождается утратой некоторых антигенов, например, генов семейства *GAGE*. Стоит отметить, что тератокарциномные клетки человека отличались от ЭСК по отсутствию некоторых антигенов. Вариабельность между разными линиями опухолей человека высока и связано это напрямую с тканевой принадлежностью опухолей. Большой объем экспериментальной работы был проведен по анализу РТА в ЭСК, ЭГК и тератокарциномных клетках мыши, показавший различия клеточных линий от эндогенных дифференцирующихся половых клеток. Глава 3 посвящена изучению сигнальных путей плюрипотентных стволовых и тератокарциномных клеток. Общий вывод, сделанный автором, сводится к тому, что самообновление плюрипотентных клеток *in vitro* достигается с помощью различных схем регуляций *ActivinA/Nodal/Lefty/Smad2/3* и *BMP/Smad1/5/8* сигнального пути *TGFβ*, причем имеются различия в экспрессии факторов семейства *TGFβ* и *FGF2* в ЭСК и ЭСК человека и мыши. В целом эта глава 3 насыщена богатым экспериментальным материалом и производит позитивное впечатление, как объемом, так и разнообразием клеточных моделей. Глава 4 содержит большой экспериментальный материал по формированию опухолей из ЭСК человека и мыши в зависимости от места трансплантации. Показаны достоинства и недостатки подкожного введения тестируемых клеток и перитонеального способа введения. Вывод автора сводится к рекомендации использовать оба способа, поскольку ложноотрицательные результаты могут быть получены либо из-за недостаточного числа трансплантируемых клеток или различий локальной васкуляризации трансплантата. Отмечены существенные видовые различия, тератомы формируются более эффективно из клеток мыши, чем человека. Последняя глава 5 посвящена моделированию раннего развития посредством формирования эмбрионидных телец (ЭТ) в суспензионных культурах ЭСК и ЭГК человека и мыши. Действительно, ЭТ нередко содержат компоненты свойственные нормальным ранним эмбрионам. Автором показано, что ЭТ, сформированных ЭСК, ЭГК и ЭТК мыши, различаются значительно по способности формировать внезародышевую энтодерму, наивысшая ЭСК, а наименьшая в ЭГК. Большой объем экспериментальной работы проведен по оценке эмбриотоксического эффекта цитостатиков: митомицина С, ингибитора топоизомеразы II, ингибиторов сборки микротрубочек и синтеза белков на плюрипотентных клетках и бластоцистах мыши. Основным результатом этого исследования является – недифференцированные плюрипотентные стволовые клетки и тератокарциномные клетки мыши имеют высокую чувствительность к воздействиям различных групп цитостатиков сходную с таковой клеток внутренней массы. Чувствительность к действию цитотоксических препаратов снижается в

дифференцированных производных. Этим обстоятельством стоит учитывать при тестировании препаратов в тест-системах ЭСК. Детально изучен токсический эффект 5-гидроокситриптофана (5НТР) применяемый в терапевтических целях. Ранее было показано, что токсический эффект этого соединения незначительный при тестировании на ранних эмбрионах. Однако, как показала О.Ф.Гордеева токсический эффект 5НТР вполне ощутимый и регистрируемый при использовании ЭСК. Предполагается, что отсутствие оболочек у ЭСК обеспечивает доступность 5НТР в тестируемые клетки. Также как и в случае тестирования других соединений описанные выше, токсичный эффект снижается при дифференцировке ЭСК в ЭТ.

Раздел «Обсуждение» изложен на 35 страницах и построен в соответствии с главами «Результатов», то есть каждая глава результатов обсуждается отдельно. Суммирующее обсуждение выделено в отдельный раздел «Заключение».

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы.

Результаты работ используются при чтении специальных курсов лекций для студентов кафедры эмбриологии биофака Московского государственного университета. Они могут быть рекомендованы в курсах лекций по биологии развития и клеточной биологии в других высших учебных заведениях биологического профиля.

Результаты исследований ранней 3D-дифференцировки линий плюрипотентных стволовых клеток могут быть использованы в качестве *in vitro* модели раннего развития млекопитающих перспективной в качестве высокотехнологичной тест-системы при апробации фармакологических и токсикологических исследований новых лекарств и химических веществ.

Личный вклад автора. Основные результаты работы получены лично автором, под его непосредственным руководством или при его непосредственном участии в планировании и проведении экспериментов. Имена соавторов указаны в соответствующих публикациях

Апробация работы.

Основные научные результаты диссертации были представлены на Всероссийских симпозиумах по биологии клетки в культуре (Санкт-Петербург, 2001, 2003, 2006, 2007, 2009, 2013), на международных конференциях по биологии стволовых клеток Annual Meeting of the International Society for Stem Cell Research (Сан-Франциско, США, 005; Торонто, Канада, 2006;

Кернс, Австралия, 2007; Филадельфия, США, 2008; Барселона, Испания, 2009; Сан-Франциско, США, 2010; Йокогама, Япония, 2012; Флоренция, Италия, 2013), на международных конгрессах 30th FEBS Congress -9th IUBMB Conference "The Protein World Proteins and Peptides: Structure, Function and Organization" (Будапешт,

Венгрия, 2005) и 31st FEBS Congress (Стамбул, Турция, 2006), на II, III и IV съездах общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова (Москва, 2004, 2005, 2006), на VI Международной конференции по молекулярной генетике соматических клеток (Звенигород, 2005), на II и IV ежегодных конференциях "Стволовые клетки и перспектива их использования в здравоохранении" (Москва, РГМУ, 2003, 2005), на I и III конференциях "Стволовые клетки: фундаментальные аспекты" (Москва, 2005, 2011), на международной конференции по биологии развития Joint Annual Spring Meeting of British Societies for Cell and Developmental Biology (Йорк, Великобритания, 2006), на Первом Российском Форуме "Новые технологии – инновационному бизнесу" (Москва, 2007), на Всероссийской научно-практической конференции "Питательные среды и методы культивирования клеток" (Пущино, 2007), на 14 Европейском конгрессе по биотехнологии "Symbiosis: Science, Industry & Society" (Барселона, Испания, 2009), на международных конгрессах по регенеративной медицине I и III Annual World Congress Regenerative Medicine and Stem Cells (Фошан, Китай 2008; Шанхай, Китай, 2010), на 14th International Biotechnology Symposium and Exhibition Biotechnology for the Sustainability of Human Society (Римини, Италия, 2010) на международной конференции по биологии стволовых клеток International Conference "Stem Cells in Development and Disease" (Берлин, Германия, 2011), на Школе-конференции "Клеточные технологии для регенеративной медицины" (Санкт-Петербург, 2011), на конференции "Морфогенез в индивидуальном развитии" (Москва, 2012), на Всероссийской конференции к 135-летию со дня рождения П.П. Иванова "Эмбриональное развитие, морфогенез и эволюция" (Санкт-Петербург, 2013), а также обсуждены на межинститутском Семинаре "Современные проблемы генетики человека" (Институт молекулярной генетики РАН, Москва, 20 апреля 2006), семинаре для аспирантов и молодых ученых Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН (Москва, 8 апреля 2008), объединенных семинарах лабораторий ИБР РАН и ИНЦ РАН (Москва и Санкт-Петербург, июнь 2014).

Замечания к работе.

Литературный обзор охватывает основной массив публикаций, описывающий многие аспекты базовых свойств ЭСК, ЭГК и тератокарциномных клеток. Тем не менее, есть неудачные места. Например, утверждение на стр. 20 «Наконец, эффективное и быстрое

