

Отзыв официального оппонента

о диссертации Кристины Эдуардовны Трифионовой

«Особенности распределения штамма мезенхимальных стволовых клеток в условиях опухолевого роста после сингенной трансплантации мышам линии C57BL/6», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Диссертационная работа посвящена изучению распределения мезенхимальных стволовых клеток (МСК) после внутривенной трансплантации в условиях опухолевого роста на модели меланомы. В работе проведен анализ миграционной активности МСК в условиях *in vitro* и *in vivo*; особое внимание уделено миграции МСК в область опухоли. В обзоре литературы имеются сведения о том, что специфичность миграции МСК в область опухоли чувствительна к источнику МСК, способу и срокам их введения в организм. Это и определило проблематику диссертации - получение линии МСК и изучение их миграции в контролируемых автором условиях. Исследование определенно является актуальным.

Обзор литературы диссертации содержит сведения о способах использования МСК для доставки цитокинов, пролекарств, онколитических вирусов, антиангиогенных лекарств, и проапоптотических регуляторов в опухолевый очаг. Также представлены данные о влиянии самих МСК на опухолевых процесс. Имеющиеся данные также показывают, что влияние МСК не является единообразным, а очень чувствительно ко многим факторам. Таким образом, поставленная перед диссертантом задача: изучить распределение МСК после внутривенной трансплантации в условиях опухолевого роста на модели меланомы, фиксирует (по-крайней мере частично) эти факторы и, поэтому, является логичным выводом обзора литературы. Выбор сингенной трансплантации для исследования тоже очень логичен.

В разделе Материалы и Методы работы содержится описание использованных методики получения МСК, их характеристики плане возможной дифференцировки, иммунотипирования на проточном цитометре и гистологической локализации. Согласен с тем, что использование ПЦР в реальном времени является хорошим подходом для исследования миграции клеток в организме.

Автором была получена, охарактеризована и заложена на хранение клеточная культура МСК BMMSC-C57BL/6 из костного мозга мыши. Эта клеточная линия может далее быть использована в исследованиях поведения МСК у модельных животных. Эта часть исследования является важной, и более легким путем было бы взять для

исследования уже существующие клеточные линии. Однако, в силу отмеченного в обзоре литературы, влияния способа получения культуры МСК на их миграционные свойства, получение и характеристика собственной линии выглядит логичной. Действительно, если иметь в перспективе создание терапевтических препаратов на основе МСК, то надо хорошо отработать и этот этап тоже. Проведенные автором исследования учитывают критерии комитета Международного Общества по клеточной терапии 2006г. Это повышает значимость результата.

В выводе 2 диссертации автор показывает, что опухолевые клетки меланомы B16-F10 стимулируют миграционную активность МСК костного мозга в системе *in vitro*. Экспериментальное доказательство этого факта - достаточное.

В выводе 3 диссертации показано, что внутривенное введение сингенных МСК через 3 суток после прививки меланомы B16-F10 не оказывает влияния на опухолевый рост и на выживаемость животных – носителей опухоли. С первой частью вывода можно согласиться. Статистика, на которой основана вторая часть вывода, составляет 10 особей в опыте и контроле, это не много. Известны, однако, публикации в которых сходные задачи решались на столь же малой выборке. Поэтому и вторую часть вывода можно принять, хотя, имея собственный опыт по анализу кривых выживания, я бы проявил осторожность в этом отношении.

В выводе 4 диссертации констатируется, что в опухолевой ткани максимальное количество введенных МСК выявлено через 3 суток после трансплантации. В это время количество введенных клеток в сердце и головном мозге превышает число МСК мигрировавших в опухоль. Через 7 и 14 суток после трансплантации МСК обнаруживаются в костном мозге мышей с меланомой, тогда как в костном мозге интактных животных таких клеток мало.

Таким образом, популяция МСК является довольно подвижной и их локализация в опухолевом очаге не является абсолютной. Заметим, что даже такая "преходящая" локализация может иметь ценность. Действительно, известны генно-инженерные конструкции, которые могут быть индуцированы в определенный момент времени за счет направленного внешнего воздействия (*hs*-промоторы) или за счет появления в окружающей среде определенного химического сигнала (*Gene-Switch* промоторы). Комбинация таких конструкций с известным распределением МСК по органам в

различные моменты времени может усилить специфичность доставки веществ в опухолевый очаг.

Проведенные эксперименты также показывают трудности терапии с помощью МСК - высокую чувствительность такого подхода к ряду неконтролируемых факторов - способ получения, способ введения, природа опухоли и т.д. Изученное автором распределение МСК по тканям только частично согласуется с описанным в литературе. Т.е. полученные линии МСК друг от друга отличаются. Это говорит о том, что подход с МСК терапией будет крайне специфичен как для опухоли, так и для культуры МСК. Последнее делает маловероятным индивидуальную МСК терапию своими же клетками в обозримом будущем, поскольку в этом случае не будет времени, ни возможности для изучения распределения по МСК по тканям. В то же время, нельзя полностью исключить, что обойти эти трудности окажется возможным при более полной изученности распределения по органам МСК, приготовленных разными способами, либо с помощью локальной активации МСК в опухолевом очаге.

Замечу также, что в работе изучена только одна линия клеток и только одна опухолевая линия. В то же время ясно, что переводимые в культуру клетки хотя и имеют одинаковый геном, но их эпигенетика разная и их миграция может различаться. Таким образом, есть основания для расширения поиска - надо понять насколько будут различаться в отношении миграции клетки, полученные по одному протоколу. То же самое справедливо и для использованной опухолевой линии. Конечно, такие эксперименты не дадут непосредственной практической отдачи, однако станут понятны перспективы подхода с МСК.

По результатам диссертации имеется 3 публикации в журналах ВАК и тезисов. Таким образом, формальные требования к публикациям удовлетворены. Публикации достаточной **полнотой** отражают содержание диссертационной работы. Объем диссертации составляет 105 машинописных страниц, включая 20 рисунков. Список литературы содержит 141 ссылку.

Теоретическая значимость работы состоит в том, что для полученной автором клеточной линии выполнены довольно детальные исследования распределения МСК у мыши с привитой опухолью. Можно видеть, что специфичность этих клеток для опухолевого очага далеко не абсолютна, а носит транзитивный характер. Тем не менее, даже такое поведение можно использовать для доставки веществ в опухолевый очаг.

Практическая ценность диссертации, состоит в получении клеточной культуры, которая может быть далее использована исследователями для сравнения с другими культурами МСК как в плане доставки лекарств, так и собственно миграции клеток в опухолевый очаг.

Личный вклад диссертанта в работу высок.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации

Результаты проведенной работы показали, что полученные МСК имеют некоторую специфичность в отношении выбранной авторами опухоли в определенный момент времени. Если в клетки полученной культуры ввести наноматериалы (таковых в настоящее время известно достаточно много) и некоторый момент времени (определенный в диссертации) нагреть их локально с помощью внешнего поля, то возможно получится физически выжечь опухоль.

Оценка содержания диссертации, ее завершенность

В работе приведен обширный и **ценный** экспериментальный материал тканевой локализации полученных в работе МСК. В плане характеристики рассмотренного клеточного штамма работа может считаться **завершенной**.

Заключение

Диссертация является **законченным** научно-исследовательским трудом, выполненным автором самостоятельно на высоком научном уровне. Полученные автором результаты **достоверны**, выводы и заключения **обоснованы**. Материалы диссертации **полно** отражены в публикациях автора, автореферат соответствует основному содержанию диссертации.

Работа **удовлетворяет** всем требованиям ВАК, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук п. 7 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», а ее автор Кристина Эдуардовна Трифонова, **заслуживает** присвоения ей искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Омельянчук Л.В. Д.б.н., зав. Лабораторией Генетики
Клеточного цикла Института молекулярной
и клеточной биологии СО РАН,
Новосибирск 630090, Лаврентьева 8/2,
ome@mcb.nsc.ru

« 2 » февраля 2016 г.

