

ОТЗЫВ

официального оппонента, профессора кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии лечебный факультета ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России, доктора медицинских наук, профессора Дубовой Татьяны Клеоники на диссертацию Зуриной Ирины Михайловны «Сравнительное исследование эпителио-мезенхимной пластичности соматических клеток человека в условиях 3D культивирования», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.03.03 – «Патологическая физиология».

Актуальность темы выполненной работы

Эпителио-мезенхимная пластичность клеток, которая выражается в изменении набора фенотипических и морфологических признаков эпителиальных и мезенхимных клеток, является одним из ключевых свойств клеток, обеспечивающих нормальное развитие организма. Эпителио-мезенхимная пластичность, кроме того, лежит в основе нормальных регенеративных процессов в постэмбриональном периоде. Нарушение программы поддержания равновесия между двумя фенотипическими состояниями клеток приводит к развитию таких распространенных патологических состояний как фиброз и метастазирование злокачественных новообразований. Попытки контролировать и управлять эпителио-мезенхимной пластичностью клеток, смещать баланс в нужную сторону, дают надежду на повышение эффективности лечения ряда заболеваний. В связи с этим, экспериментальные исследования, направленные на изучение клеточных механизмов регуляции эпителио-мезенхимных и мезенхимо-эпителиальных переходов, а также особенностей пластичности клеток из разных источников, которым и посвящена работа Зуриной И.М., являются актуальными и востребованными в современной фундаментальной и прикладной биомедицинской науке.

Научная новизна полученных результатов

В настоящем исследовании впервые был поставлен вопрос о влиянии тканеспецифичности эпителио-мезенхимной пластичности разных типов клеток на способность тканей к нормальной безрубцовой репарации. До настоящего времени не было проведено комплексного сравнительного исследования пластичности соматических клеток разного фенотипа, выделенных из тканей с разным регенеративным потенциалом. В своей работе для выявления

особенностей изменения клеточного фенотипа автор впервые предлагает использовать подход с чередованием 2D и 3D условий культивирования, который за счет спонтанной индукции эпителио-мезенхимных и мезенхимо-эпителиальных переходов позволил выявить разницу в пластичности выбранных типов клеток.

Использование двух моделей повреждения *in vitro* (нанесение «царапины» на монослой клеток и лазерная микродиссекция сфероидов) впервые позволило показать особенности миграционной активности эпителиальных и мезенхимных клеток, напрямую связанную с репарацией, а также способность сфероидов, состоящих из эпителио-мезенхимных пластичных клеток к саморепарации за счет способности дормантных клеток сфероидов к перераспределению и активации фенотипа.

Таким образом, проведенные диссертантом исследования вносят значительный вклад в понимание фундаментальных процессов эпителио-мезенхимных переходов и их роли и значимости в способности тканей и органов к нормальной регенерации и репарации в отсутствие фиброза.

Степень достоверности результатов и обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

В работе Зуриной И.М. были использованы клетки из четырех типов тканей, два образца для каждой. Использование широкого спектра современных методов клеточной биологии, таких как 2D и 3D подходы к культивированию клеток, методы световой, конфокальной и электронной микроскопии, методы проточной цитофлуориметрии и иммуноцитохимического окрашивания в сочетании с аппаратом математического моделирования, а также применение 2D и 3D моделей повреждения *in vitro*, позволило автору получить большой объем данных, которые представляются убедительными и достоверными. Иллюстративный материал подробно описан, корректно подобраны маркеры для характеристики клеток.

По результатам работы сформулировано 7 выводов, которые четко вытекают из описанных экспериментов, отвечают на поставленные автором задачи и представляются обоснованными. Результаты работы опубликованы в виде статей в российских и зарубежных рецензируемых журналах и апробированы на международных конференциях. В связи с этим, достоверность представленной автором работы не вызывает сомнений.

Общая структура и содержание диссертационной работы

Диссертация Зуриной И.М. составлена по традиционному плану, логично построена, доступно и профессионально написана. Диссертация изложена на 176 страницах машинописного текста, представлены все необходимые по требованиям ВАК разделы: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение», «Заключение», «Выводы» и «Список литературы», а также содержит список сокращений. Диссертационная работа аккуратно оформлена и хорошо иллюстрирована, содержит 50 рисунков и 6 таблиц. Библиография включает 191 источник, из которых 2 написаны на русском языке и 189 – на английском.

В разделе «Введение» диссертант приводит краткое введение в тему диссертационной работы, рассматривает ее актуальность, а также фундаментальные и прикладные перспективы, на основе чего формулирует цель и задачи исследования.

Обзор литературы изложен на 39 страницах машинописного текста, и содержит несколько разделов. В первой части обзора подробно рассмотрены разные уровни регуляции процесса эпителио-мезенхимных переходов. Таким образом автор подчеркнул сложность и многофакторность изучаемого явления. Второй раздел обзорной части работы посвящен роли эпителио-мезенхимной пластичности резидентных эпителиальных клеток в развитии фиброза в различных органах. Последняя часть обзора литературы рассматривает роль обратимых эпителио-мезенхимных переходов в дедифференцировке и репрограммировании соматических клеток, а также проявления пластичности при переходе от методов монослойного культивирования к трехмерному. Таким образом, обзор литературы содержит всю информацию, необходимую для понимания предмета исследования и полученных автором результатов.

Глава «Материалы и методы» содержит подробное описание использованных в работе методик, которые включают протоколы выделения четырех типов клеток разного фенотипа, подходы 2D и 3D культивирования, а также систему вторичноприкрепленной культуры. Для анализа разных типов культур были использованы методы проточной цитофлуориметрии, иммуноцитохимии и лазерной сканирующей конфокальной микроскопии, а также прижизненной цейтраферной, просвечивающей и растровой электронной микроскопии. Для моделирования повреждения в монослойной культуре был применен тест «заживление царапины», а в 3D системе – повреждение

сфероидов наносекундным лазерным скальпелем. Набор использованных в исследовании методик представляется исчерпывающим для достижения поставленных задач.

Глава «Результаты» состоит из шести разделов, которые подробно описывают все этапы проведенного исследования. Первая часть посвящена описанию морфологии и изменений признаков разных типов клеток в монослойной культуре. На данном этапе автором была выявлена разница в эпителио-мезенхимной пластичности двух эпителиальных культур: клетки ретинального пигментного эпителия быстро теряли эпителиальные характеристики и приобретали признаки мезенхимных клеток, в то время как клетки буккального эпителия в течение длительного времени сохраняли исходные характеристики. Для мезенхимных клеток лимба было подтверждено присутствие в первичной культуре эпителиальной составляющей, которая полностью исчезала при дальнейшем культивировании. Кроме того, автором на модели повреждения монослоя клеток в тесте «заживление царапины» с использованием метода прижизненной съемки было показано уникальное коллективное поведение клеток буккального эпителия, которые мигрировали единым пластом без разрушения межклеточных контактов, при этом морфология клеток незначительно изменялась в сторону мезенхимной, но быстро восстанавливалась после полного закрытия «царапины».

Второй раздел посвящен математическому моделированию процесса сфероидогенеза, которое было необходимо для определения оптимальных стандартных условий 3D культивирования клеток разного фенотипа. Кроме того, использование данного подхода выявило различия в динамике компактизации структур из клеток эпителиального и мезенхимного фенотипов, что позволило автору предположить зависимость механизмов формирования сфероидов от исходного фенотипа клеток.

В третьей части, в которой подробно описано строение сфероидов из четырех типов клеток, автору удалось найти подтверждение гипотезе о разных механизмах сфероидогенеза для разных типов клеток. При смещении баланса характеристик в сторону эпителиального фенотипа в сфероидах наблюдали преимущественно формирование межклеточных контактов разного типа не только на поверхности, но и в толще сфероидов, в то время как клетки мезенхимного фенотипа формировали структуры с большим количеством внеклеточного матрикса, а межклеточные контакты формировались только

между поверхностными клетками. Кроме того, потеря эпителиальными клетками в монослойной культуре исходных характеристик приводила к снижению пластичности, что выражалось в неспособности клеток восстановить исходный фенотип.

Четвертый раздел описывает изменения пролиферативной активности клеток, которые происходят при переходе от монослойного к 3D культивированию. Формирование трехмерных структур с восстановлением межклеточных контактов приводит к остановке клеточного цикла, в результате чего сфероиды являются покоящимися структурами, которые более точно воспроизводят условия нативной ткани, чем монослойные культуры, и способствуют более длительному поддержанию жизнеспособности и функциональности клеток в составе сфероидов.

Пятая часть посвящена изучению и сравнению клеток в составе сфероидов к реактивации в условиях вторичной адгезии при помещении сфероидов на культуральный пластик. Вторичная адгезия стимулировала миграцию клеток, что приводило также к реактивации клеточного цикла. При этом характер миграции и поведения клеток вновь значительно различался. Для букального эпителия вновь была характерна коллективная миграция клеток, сохраняющих межклеточные контакты и эпителиальную морфологию, в то время как клетки пигментного эпителия сетчатки, восстановившие эпителиальные характеристики в условиях 3D культивирования, вновь приобретали признаки мезенхимных клеток.

Последний раздел рассматривает динамику и характер репарации сфероидов из самой пластичной культуры – пигментного эпителия сетчатки на модели повреждения наносекундным лазерным скальпелем. Автор показал, что заживление «раны» происходит за счет перераспределения пластичных клеток, а не их пролиферации, что более точно воспроизводит динамику одного из возможных путей физиологической регенерации или репарации после повреждения в организме.

В главе «Обсуждение» обобщены результаты работы и прослежена их взаимосвязь с имеющимися в литературе данными.

В заключительной части работы представлено резюме проведенного исследования, а также выводы, сделанные на основании полученных диссертантом данных. Выводы обоснованы и отвечают поставленным автором задачам.

Теоретическая и научно-практическая значимость работы

Помимо несомненного фундаментального вклада в базу знаний об эпителио-мезенхимной пластичности соматических клеток человека, работа Зуриной И.М. представляет и практический интерес для современной биологии и медицины, поскольку комбинированное использование подходов 2D и 3D культивирования может применяться для широкого спектра клеток человеческого организма с целью поиска средств управления тканеспецифической эпителио-мезенхимной пластичностью и смещения баланса регенеративных процессов в стороны нормальной репарации.

Культура буккального эпителия, более стабильно сохраняющая фенотип клеток, в отличие от других первичных эпителиальных культур, может стать уникальным инструментом в поиске фундаментальных основ безрубцовой репарации. Кроме того, описанный метод получения сфероидов из клеток буккального эпителия и вторичноприкрепленных культур на их основе может найти широко применение в области стремительно развивающейся тканевой инженерии и регенеративной медицины.

Сведения о полноте опубликованных научных результатов

Полученные автором данные опубликованы в 13 статьях, в том числе 10 работ в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ, и 2 статьи в рецензируемых журналах списка Web of Science, а также представлены в виде 13 тезисов докладов на российских и международных конференциях.

Соответствие автореферата основным положениям диссертации

Автореферат диссертации Зуриной И.М. полностью соответствуют основным положениям диссертации, в нем отражены актуальность темы, научная новизна, теоретическая и практическая значимость, положения, выносимые на защиту, основные результаты, их обсуждение и выводы.

Диссертация – написана хорошим литературным языком, четко структурирована и очень хорошо проиллюстрирована. Принципиальных замечаний нет.

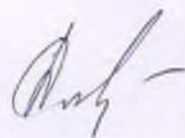
Пожелание: учитывая несомненный интерес исследователей к изучаемой проблеме, хотелось бы увидеть в диссертации большее количество ссылок на работы отечественных исследователей.

Заключение

Работа И.М. Зуриной посвящена актуальной и важной научной проблеме, проведено с использованием широкого спектра современных методов, содержит

уникальные результаты, является законченной научно-квалификационной работой. Все сформулированные выводы обоснованы и логично следуют из полученных автором результатов, и их интерпретации. Оформление работы отвечает всем требованиям ВАК, предъявляемым к кандидатским диссертациям. Диссертация Зуриной Ирины Михайловны «Сравнительное исследование эпителио-мезенхимной пластичности соматических клеток человека в условиях 3D культивирования» по актуальности, новизне, научному и методическому уровню, научно-практической значимости и достоверности полученных результатов полностью соответствует требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения учёных степеней», утвержденным постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842 (с изменениями в редакции постановлений Правительства РФ №335 от 21.04.2016, №748 от 02.08.2016), а ее автор заслуживает искомой степени кандидата биологических наук по специальностям 14.03.03 – Патологическая физиология.

Профессор кафедры
гистологии, эмбриологии и цитологии
лечебного факультета ФГБОУ ВО
«Российский национальный
исследовательский медицинский
университет имени Н.И. Пирогова»
Минздрава России,
Доктор медицинских наук, профессор,



Дубовая Т.К.

117997, г. Москва, ул. Островитянова, д.1.
E-mail: gusvbr@mail.ru
Тел.: 8 (495) 434 40 83

Подпись профессора Т.К. Дубовой заверяю

Ученый секретарь ФГБОУ ВО РИИМУ
им. Н.И. Пирогова Минздрава РФ,
доктор медицинских наук, доцент

02.02.2018



Милушкина О. Ю.