

ОТЗЫВ

официального оппонента члена-корреспондента Российской академии наук, доктора медицинских наук, профессора Буравковой Людмилы Борисовны на диссертацию Бородкиной Александры Васильевны «Молекулярные механизмы ответов эндометриальных стволовых клеток человека на окислительный стресс», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 - клеточная биология, цитология, гистология

Интенсивное развитие регенеративной медицины привлекает особое внимание к изучению стволовых клеток взрослого организма. Тканевые источники мезенхимных стволовых клеток расширяются стремительно, их выделяют из различных органов и тканей, изучают различные функциональные свойства и возможность использования в клинической практике. Диссертация А.В.Бородкиной посвящена исследованию особенностей эндометриальных стволовых клеток и влиянию окислительного стресса *in vitro* на некоторые сигнальные пути регуляции состояния этих клеток.

Актуальность данного исследования не вызывает сомнений. Она обусловлена стремительным развитием регенеративной медицины и активными попытками использования стволовых клеток для репарации тканей и лечения ряда заболеваний. В то же время противоречивость экспериментальных данных, отсутствие стандартизированных процедур для выделения и культивирования стволовых клеток взрослого организма демонстрирует недостаточность изучения проблемы, а также ее теоретическую и практическую значимость. Выяснение закономерностей поведения мезенхимных стволовых клеток на окислительный стресс является важной фундаментальной задачей, решение которой существенно подкрепило бы научную базу знаний и позволило бы прийти к пониманию ряда важных процессов на совершенно новом уровне. Безусловно, используемый источник стволовых клеток еще больше актуализирует полученные в работе результаты, поскольку перед нами одна из немногочисленных работ, в которой изучены эндометриальные стволовые клетки. Именно поэтому представленная диссертация Бородкиной А.В. созвучна современному состоянию данного направления биологии и медицины.

Диссертационная работа построена по традиционному плану. Объем ее оптимален - 143 страница, полученные результаты хорошо документированы и иллюстрированы (72 рисунка). Во введении изложены достаточно убедительные обоснования необходимости исследования выбранной проблемы. Кроме того, как это принято, сформулированы цель и задачи исследования, основные положения, выносимые на защиту, отмечена научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы.

Обзор литературы состоит из 5 частей, в которых хорошим литературным языком изложены основные представления о стволовых клетках, окислительном стрессе, апоптозе, феномене клеточного старения и его механизмах. Автор логично переходит от раздела к разделу, иллюстрирует основные положения схемами со ссылками из литературных источников. Список цитированной литературы включает 380 источников, из которых только 10 отечественных и 370 иностранных публикаций. К сожалению, в работе не проанализированы работы ряда российских исследователей, касающиеся окислительного стресса, гипоксии и репликативного старения, а также более ранние работы зарубежных исследователей, анализирующие эффекты окислительного стресса в стромальных клетках.

Глава «Материалы и методы исследования» содержит описание методов подготовки и культивирования клеток, а также аналитические методы, использованные в диссертационной работе. В целом, все методики описаны достаточно подробно и дают полное представление об использованных подходах. В разделе целесообразно было бы добавить информацию об использованной мощности лазера, поскольку от этого зависит доза облучения и, соответственно, «обесцвечивание» (bleaching) используемого красителя, а также снижение жизнеспособности клетки.

Экспериментальные результаты исследования подробно описаны в большой главе (более 45 стр.) и оставляют самое благоприятное впечатление. Логика изложения данных позволяет проследить ход экспериментальных исследований и убедиться в хорошей обоснованности основных заключений работы. Так, на первом этапе в главе 3.2 доказано, что динамика H_2O_2 -индуцированного апоптоза в ЭСК, фибробластах и эМСК существенно различается. После чего автор переходит к анализу процессов преждевременного старения после сублетального окислительного стресса. Для этого используется не только широко используемый способ окраски на β -галактозидазу, но и продемонстрирован арест клеточного цикла при переходе клеток из G1 в S фазу, а также снижение экспрессии белка PCNA и отсутствие Ki67-позитивных клеток. Изучая механизмы этого явления, диссертант установил, что активация p16/Rb и p21/Rb путей, приводящих к аресту клеточного цикла, необходима для индукции преждевременного старения эМСК в условиях окислительного стресса.

В качестве дискуссии хотелось бы просить диссертанта пояснить результаты, представленные на рис. 34. Судя по данным, полученным при конфокальной микроскопии, в исследуемых клетках регистрируется различный уровень АФК. При этом в клетках, где уровень был высоким в ответ на H_2O_2 , он, несколько снижаясь через 60 мин, все-таки оставался высоким. Результаты цитофлуориметрии показывают, что через 60 минут средняя интенсивность флуоресценции снижалась до контроля. Кроме того, необходимо отметить, что стабилизация или снижение АФК в клетке при инкубации с перекисью водорода не является прямым доказательством «полной утилизации экзогенной H_2O_2 ».

В следующем достаточно большом экспериментальном разделе диссертации анализируются ранние ответы и активация членов семейства MAP-киназ, которые продемонстрировали правильность первоначальных предположений автора. В работе предпринята обоснованная попытка установить связь между уровнем АФК и состоянием митохондрий. Однако, полученная корреляционная связь между мембранным потенциалом митохондрий и так называемой «митохондриальной массой» (оба показателя получены при использовании различных флуоресцентных красителей) не является прямым доказательством «увеличения числа митохондрий в стареющих клетках», а взаимодействие АФК и митохондрий, скорее всего носит более сложный и двунаправленный характер, в зависимости от состояния клетки и уровня АФК. С другой стороны, проанализировав некоторые молекулярные механизмы инициации процессов старения МСК, автор убедительно показал, что все участники ответа на повреждение ДНК (ATM, H2AX, 53BP1, p53, Chk2) в процессе H₂O₂-индуцированного старения ЭМСК находятся в активном состоянии, что может быть причиной перманентной генерации внутриклеточных АФК. При этом независимо от пути активации, экспрессия белка p21 приводит к гипофосфорилированию Rb и к блоку клеточного цикла.

Безусловно, важным с **практической точки зрения** является раздел, в котором изучались пути предотвращения преждевременного старения ЭМСК в условиях окислительного стресса. Для этого были использованы фармакологические ингибиторы продукции АФК с разной химической структурой и механизмом действия – diphenylene iodonium (DPI) и N-acetyl-cysteine (NAC), которые доступны и широко используются для супрессии АФК. Надо отдать должное диссертанту, за вдумчивый, последовательный и критичный анализ полученных данных, позволивший выявить детали действия антиоксидантов на процессы старения МСК. Также убедительны экспериментальные данные, полученные при модуляции уровня фосфорилирования MAP-киназы p38 и MK-2, показавшие, что p38 участвует как в инициации, так и в развитии преждевременного старения ЭМСК в условиях окислительного стресса, тогда как ингибирование ее активности частично предотвращает старение. Таким образом, проведенная детальная работа по оценке эффективности этих соединений, позволила автору выявить условия возможного предотвращения развития H₂O₂-индуцированного старения ЭМСК.

Все полученные результаты подробно описаны, хорошо проиллюстрированы как первичным экспериментальным материалом, так и статистически обработанными данными, что свидетельствуют о достоверности полученных результатов, обоснованности выводов и основных положений диссертаций. В хорошо написанном и легко читаемом обсуждении проведено сравнение с результатами зарубежных исследователей, сделаны адекватные выводы.

Научная новизна. Анализируя представленную работу, можно сказать, что автор впервые получил уникальный материал об изменении свойств эндометриальных

мезенхимальных стволовых клеток при индуцированном окислительном стрессе и сигнальных механизмах последующего старения их *in vitro*. Эти данные, несомненно, будут использованы в дальнейших исследованиях, направленных на фундаментальные исследования и применение культивируемых клеток в регенеративной медицине.

В частности, анализ жизнеспособности при действии различных доз перекиси водорода выявил высокую устойчивость эндометриальных стволовых клеток по сравнению с эмбриональными. Как показало изучение реакций клеток на летальные дозы окислителя, высокие дозы H_2O_2 , индивидуальные для каждого типа исследуемых клеток, вызывали каспаза-зависимый апоптоз, который характеризовался принципиально различной динамикой.

При изучении молекулярных механизмов, лежащих в основе стресс-индуцированного старения, автор выделяет две стадии этого процесса – инициацию и стабилизацию. Впервые показано, что индукция старения обеспечивается быстрым проникновением H_2O_2 в клетки и последующей инициацией ответа на повреждение ДНК, который через ATM/Chk2/p53/21/Rb путь приводит к блоку клеточного цикла. В реализации второй стадии старения эМСК продемонстрирована определяющая роль эндогенных активных форм кислорода (АФК). Впервые установлено, что для стабилизации старения эМСК необходимо поддержание ответа на повреждение ДНК в постоянно активном состоянии. Приоритетными являются результаты, свидетельствующие о несомненной роли ASK1/p38/MAPKAPK-2/Rb сигнального пути как в обеих стадиях процесса старения эМСК, так и в регуляции продукции эндогенных АФК.

Необходимо отметить комплексный подход, использованный автором при решении поставленных задач, который позволил получить чрезвычайно важные научные результаты, расширяющие наши представления о стресс-индуцированном старении эндометриальных стволовых клеток.

Материалы диссертации достаточно полно отражены в опубликованных работах (4 статьи) и многократно докладывались на Всесоюзных и международных конференциях.

Автореферат полностью соответствует диссертационной работе, хорошо написан и оформлен. Прекрасно отредактированный текст как диссертации, так и автореферата может служить образцом для научных квалификационных работ.

При анализе работы возникает несколько вопросов, которые могли бы уточнить характеристики используемых в эксперименте клеток, а именно, каков иммунофенотип эндометриальных стволовых клеток человека; отличается ли он от иммунофенотипа других мезенхимных стволовых клеток взрослого организма, выделяемых из различных тканей; что известно о дифференцировочном потенциале эМСК?

Заключение.

По актуальности, новизне, объему проведенных исследований диссертация Бородкиной Александры Васильевны «Молекулярные механизмы ответов эндометриальных стволовых клеток человека на окислительный стресс» является научно-квалификационной работой и соответствует требованиям п.9 «Положения о присуждении ученых степеней от 24 сентября 2013 г. №842, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации, предъявляемым к диссертациям, выдвигаемым на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор заслуживает присвоения искомой степени по специальности 03.03.04 - клеточная биология, цитология, гистология.

Ученый секретарь Института,
зав. лабораторией «Клеточной физиологии»
ФГБУН ГНЦ РФ – ИМБП РАН,
д.м.н., проф., чл-корр. РАН

Л.Б.Буравкова

Подпись д.м.н., проф., чл-корр РАН Л.Б.Буравковой заверяю:

Заместитель директора по науке

В.Н.Сычев



Данные об авторе отзыва:

Буравкова Людмила Борисовна
Ученый секретарь Федерального государственного
Бюджетного учреждения науки Государственного научного центра
Российской Федерации – Института медико-биологических проблем
Российской академии наук.
Адрес: 124007, Москва, Хорошевское ш. 76-а
Тел. 8-499-195-22-43, e-mail buravkova@imbp.ru