

Отзыв

официального оппонента на работу Бородкиной Александры Васильевны «Молекулярные механизмы ответов эндометриальных стволовых клеток на окислительный стресс», представленную на соискание степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – «клеточная биология, цитология, гистология»

Актуальность и научная новизна исследования.

Несмотря на то, что механизмы клеточного ответа на стресс и, в частности, механизмы клеточной смерти, изучаются более полувека, сегодня исследования в данной области занимают одно из центральных мест в современной молекулярной и клеточной биологии. Это связано как с тем, что эта область исследований многократно расширилась благодаря открытию множества вариантов клеточного ответа на стрессовые стимулы, так и с тем, что эти исследования имеют очевидный трансляционный потенциал. Стоит также отметить, что за последнее пятнадцатилетие в связи с активным развитием основанных на использовании плюрипотентных клеток регенеративных технологий количество объектов такого рода исследований возросло многократно. Для безопасного клинического использования различных стволовых клеток – эмбриональных, индуцированных плюрипотентных, мезенхимальных – необходимо всестороннее исследование реакции этих клеток на различные экзогенные факторы, изучение вариантов и механизмов их клеточного ответа. Поэтому актуальность диссертационной работы А.В. Бородкиной, посвященной изучению молекулярных механизмов ответа эндометриальных стволовых клеток (ЭМСК) человека на окислительный стресс не вызывает у меня сомнений. Концептуально работу можно разделить на две части: меньшую, посвященную сравнительному анализу устойчивости эмбриональных, мезенхимальных стволовых клеток и фибробластов к окислительному стрессу, и, большую, направленную на идентификацию механизмов преждевременного клеточного старения ЭМСК, индуцированного сублетальным окислительным стрессом. Исследования механизмов преждевременного клеточного старения сегодня также актуальны, поскольку, несмотря на то, что общая молекулярная схема клеточного старения известна, существует зависимость от типа клеток и индуцирующего стимула вариативность механизмов развития и поддержания старения. Соответственно, новое глубокое исследование механизмов старения мезенхимальных стволовых клеток, индуцированного окислительным стрессом, безусловно имеет значение для развития этой области молекулярной биологии.

Научно-практическая значимость работы.

Значимость данной диссертационной работы для фундаментальной науки в первую очередь связана с демонстрацией факта преждевременного старения мезенхимальных стволовых клеток, изучением молекулярных механизмов данного феномена, индуцированного, в частности, окислительным стрессом. Необходимо отметить, что конкретный сигнальный путь, запускающий и поддерживающий индуцируемое окислительным стрессом старение ЭМСК, хоть и содержит известные компоненты, является новым интересным вариантом развития преждевременного старения, включающего в себя два этапа. С точки зрения практической ценности данное исследование представляется крайне важным и своевременным в связи с тем, что эндометриальные стволовые клетки являются перспективным материалом для использования в различных вариантах клеточной терапии. Естественно, для относительно безопасного использования этих клеток в трансляционных приложениях необходимо понимание возможных вариантов ответа клеток на те или иные экзогенные стимулы. Данная работа, как раз, и представляет собой достаточно полный ответ на вопрос о том, как реагируют ЭМСК на окислительный стресс.

Общая характеристика работы.

Диссертационная работа объемом 143 страницы включает в себя разделы «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение», «Заключение», «Выводы» и «Список литературы». В диссертации процитировано 380 работ; работа содержит 72 рисунка.

Во Введении автор обосновывает и формулирует цель и задачи исследования. Должен отметить, что достаточно странным для Введения выглядит наличие в нем разделов «Апробация» и «Список работ, опубликованных по теме диссертации».

Обзор литературы хорошо структурирован, написан очень понятно. Несмотря на относительно маленький объем (<30 страниц), он содержит всю необходимую для адекватного понимания диссертации информацию. Очень удачным, на мой взгляд, является то, что автор начинает обзор литературы с увлекательного рассказа об истории открытия стволовых клеток (глава 1.1.1 и рисунок 1). Обзор хорошо иллюстрирован; однако, я должен отметить, что в подписях не ко всем рисункам присутствуют ссылки на первоисточник – в частности, не обозначен источник рисунка 7. Несмотря на то, что логика обзора литературы постепенно подводит читателя к постановке задачи, самого раздела «Постановка задачи» нет, что несколько усложняет восприятие работы.

Раздел «Материалы и методы» написан подробно. Ознакомление с этим разделом позволяет воспроизвести все использованные автором методы без привлечения специальной литературы. Несомненно, автор является высококвалифицированным исследователем, владеющим большим арсеналом методов молекулярной и клеточной биологии. Поскольку основным объектом исследований являются различные клеточные линии, стоило уделить их описанию больше внимания. В частности, не ясно контролировалось ли, на каких пассажах использовались в экспериментах ЭМСК, что является немаловажным, поскольку сам автор в обзоре литературы пишет, что МСК подвержены репликативному старению.

Экспериментальные результаты работы изложены в разделе «Результаты», который состоит из шести частей. Сразу хочу отметить, что все полученные данные являются оригинальными, интересными. Кроме того, отдельно стоит подчеркнуть объем проведенной работы – достаточно сказать, что результаты иллюстрированы более чем 60 многопанельными рисунками. В то время как первые две главы посвящены сравнительному анализу устойчивости различных клеток к окислительному стрессу, основная часть раздела все-таки посвящена идентификации и анализу молекулярных механизмов индуцированного сублетальным окислительным стрессом преждевременного старения эндометриальных стволовых клеток. К данному разделу есть и некоторые замечания и вопросы.

В данной работе Вестерн-блот-анализ является одним из основных инструментов исследования. Поэтому к дизайну и представлению данных такого рода экспериментов стоит относиться более внимательно. Во-первых, ни один Вестерн-блот в работе не снабжен обозначениями маркеров масс, что несколько затрудняет самостоятельную интерпретацию результатов; во-вторых, при постановке Вестерн-блот-экспериментов по анализу фосфорилированных форм белка стоит также анализировать и уровень нефосфорилированной формы, чего в работе не сделано (см. рисунки 37, 39, 40 и др.).

В разделе 3.1 автор пишет «Диапазоны значений LD50 составили 600–700, 450–500 и 370–400 мкМ для ЭМСК, фибробластов и ЭСК», хотя из рисунка 9 этого не следует, т.к. для фибробластов и ЭСК таких экспериментальных точек нет.

В разделе 3.2.1, исследуя H₂O₂-индуцированный апоптоз ЭСК, автор приходит к выводу, что он каспаза 8- и 3-зависимый, однако, не ясно, почему анализировали уровень только этих каспаз (рисунок 13)? Почему не были проанализированы уровни экспрессии каспаз 9, 7, 10?

Раздел 3.4.1, рис. 24 – с чем связано увеличение размеров контрольных клеток на 4-5 день культивирования? Также в этом разделе было бы хорошо более подробно описать, что имеется в виду под фразой «Важно отметить хорошую корреляцию между гипертрофией обработанных клеток и накоплением белка, количество которого определяли в лизатах клеток

по методу Бредфорд». В чем состоит корреляция, как проводились измерения (на что нормировались)?

В разделе 3.4.2 на рис. 26 несколько удивительна для меня кривая роста контрольных клеток? Правильно ли я понимаю, что время удвоения интактных (не обработанных перекисью) эМСК составляет 5 дней?

В разделе 3.4.3 автор пишет «Суммируя полученные результаты, можно заключить, что активация p16/Rb и p21/Rb путей, приводящих к аресту клеточного цикла, необходима для индукции преждевременного старения эМСК в условиях окислительного стресса». Однако для такого утверждения желательно проведение дополнительных экспериментов, например, по подавлению с помощью РНК-интерференции уровня экспрессии этих генов и анализу индукции старения.

В разделе 3.5.2 утверждается, что «была показана транслокация pp53 из цитоплазмы в ядро в течение 45 мин действия H₂O₂ (рис. 38a)», хотя на представленном рисунке это не очевидно. В любом случае, для такого вывода необходимо либо провести автоматический анализ большой выборки изображений, либо использовать Вестерн-блот-анализ клеточных фракций (цитоплазма/ядро).

В разделе 3.5.4 на рис. 43a не ясно, когда начинается рост уровня внутриклеточных АФК, поскольку после кинетической точки «1 сут» сразу идет точка «5 сут». Кроме того, возникает вопрос о том, не может ли рост уровня внутриклеточных АФК быть следствием клеточного старения?

В разделе 3.6.1 на рис. 52 и 53 было бы правильно указать отличаются ли достоверно друг от друга точки «DPI-» и «DPI+».

В разделе 3.6.1 на рис. 60 и 65 вызывает вопросы количественная оценка результатов окраски на SA-β-Gal. Не понятно как проводился этот анализ, какие параметры окрашенных на SA-β-Gal клеток измерялись, что такое «значение активности β-галактозидазы»?

Рис. 66 озаглавлен «Жизнеспособность эМСК зависит от концентрации ингибитора BIRB», что, на мой взгляд, является достаточно сильным заявлением при разнице между контролем и максимальной концентрацией ингибитора менее 5%.

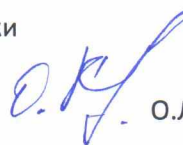
Сделанные замечания носят, в основном, рекомендательный и дискуссионный характер и не влияют на общее восприятие работы. Еще раз хочу подчеркнуть, что все эксперименты хорошо продуманы, имеют необходимые контроли, хорошо иллюстрированы. На основании полученных результатов автором сформулированы выводы, корректность которых не вызывает сомнений.

Заключение.

По теме диссертации автором опубликовано 4 научных статьи, в том числе одна – в известном журнале, посвященном вопросам старения, - Aging, что, безусловно, свидетельствует об актуальности и новизне работы. Автореферат достаточно полно отражает существо работы.

По актуальности, научной новизне и объёму проведённых исследований диссертация Бородкиной Александры Васильевны «Молекулярные механизмы ответов эндометриальных стволовых клеток человека на окислительный стресс» является научной 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 автор заслуживает присвоения искомой степени по специальности 03.03.04 - клеточная биология, цитология, гистология.

старший научный сотрудник
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института биологии гена Российской академии наук
кандидат биологических наук



О.Л. Кантидзе

10. 02. 2015

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ	
Институт биологии гена Российской академии наук (ИБГ РАН)	
Подпись лица	
заверяю	
Ученый секретарь	
Института	 Г.В.Мансурова



Данные об авторе отзыва:

Кантидзе Омар Леванович - старший научный сотрудник лаборатории Структурно-функциональной организации хромосом Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии гена Российской академии наук

Адрес: 119334, Москва, ул. Вавилова 34.5

Телефон: раб. (499)1359787; моб. (903)6857130

Email: omar.kantidze@genebiology.ru; kantidze@gmail.com