

УТВЕРЖДАЮ

ВРИО директора

Федерального государственного бюджетного
учреждения науки Института

эволюционной физиологии и биохимии

им. И.М. Сеченова Российской академии наук

(ИЭФБ РАН),

академик, профессор, д.м.н.

Н.П. Веселкин

«*ВН*» 2015 г.



О Т З Ы В

ведущей организации на диссертацию Бородкиной Александры Васильевны
“Молекулярные механизмы ответов эндометриальных стволовых клеток человека
на окислительный стресс”, представленной на соискание ученой степени
кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 — клеточная биология,
цитология, гистология

Актуальность исследования, выбор цели и задачи диссертационной работы, структура диссертации

Интенсивно развивающиеся медицинские технологии, основанные на использовании стволовых клеток, требуют понимания того, как эти клетки реагируют на стрессовые ситуации, в частности на окислительный стресс. Так установлено, что окислительный стресс приводит к преждевременному старению стволовых клеток, что снижает эффективность их использования в медицине. Это в полной мере относится к стволовым клеткам мезенхимной природы (эМСК), которые в последние годы широко применяются для трансплантации людям с

такими заболеваниями, как рассеянный склероз, мышечная дистрофия Дюшенна, острая сердечная недостаточность. Эти клетки в условиях стрессовых воздействий подвергаются преждевременному старению, которое характеризуется прекращением деления, а также секрецией во внеклеточное пространство ряда онкогенных факторов, которые могут вызывать злокачественное перерождение соседних клеток и тканей. Вследствие этого одной из актуальных проблем современной клеточной биологии и трансплантационной медицины является выяснение молекулярных механизмов, лежащих в основе преждевременного старения ЭМСК, в том числе в условиях окислительного стресса. Решение этой проблемы позволит разработать эффективные подходы для предотвращения преждевременного старения ЭМСК и повысить, таким образом, их терапевтический потенциал. Остроту проблеме преждевременного старения ЭМСК придает тот факт, что работы по практическому использованию ЭМСК в тканевой инженерии проводятся на протяжении всего лишь нескольких последних лет, поскольку сами эти клетки были открыты семь лет назад. При этом фундаментальные исследования, направленные на изучение молекулярной биологии и биохимии ЭМСК, сильно запаздывают, создавая серьезные риски для применения этих клеток в медицине. Важнейшему аспекту указанной проблемы – изучению молекулярных механизмов ответа эндометриальных стволовых клеток (ЭМСК) человека на окислительный стресс – и посвящена диссертационная работа Бородкиной А.В. В конкретные задачи предпринятого автором исследования входило проведение сравнительного анализа устойчивости ЭМСК и эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) человека к окислительному стрессу, индуцированному перекисью водорода, исследование ответа этих клеток на обработку перекисью водорода в сублетальных дозах, выяснение возможности индукции преждевременного старения ЭМСК в ответ на окислительный стресс, изучение молекулярных механизмов, лежащих в основе вызванного стрессом преждевременного старения ЭМСК, а также оценка возможности предотвращения преждевременного старения этих клеток при снижении уровня эндогенных активных форм кислорода и при ингибировании активности фермента р38-киназы.

Диссертация написана по традиционному плану и содержит все необходимые разделы – введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, результаты исследований, их обсуждение, выводы, список цитируемой литературы, включающий 380 источников. Диссертация изложена на 143 страницах, иллюстрирована 72 рисунками.

В разделе «Введение» обосновывается актуальность изучаемой проблемы, формулируются цели и задачи исследования, положения, выносимые на защиту, отмечены научная новизна полученных результатов, их теоретическое и практическое значение. Раздел «Обзор литературы» написан хорошим языком, полностью соответствует проблемам и задачам, решаемым в диссертационной работе, хорошо иллюстрирован. В нем проводится всесторонний анализ основных понятий биологии стволовых клеток, в том числе описана природа, способы выделения и характерные особенности эндометриальных стволовых клеток, выделенных из десквамированного эндометрия менструальной крови человека, которые и являются предметом исследования. Приведены данные о влиянии окислительного стресса на стволовые клетки человека, о реакциях эмбриональных и мезенхимных стволовых клеток человека на стресс, описываются молекулярные механизмы апоптоза и старения клеток. Следует отметить цельность и тщательную проработанность подраздела «Механизмы, лежащие в основе клеточного старения», который включает в себя всесторонний анализ уже верифицированных молекулярных механизмов клеточного старения, а также тех механизмов, которые еще находятся в стадии изучения. Сделан акцент на роль в старении активных форм кислорода и p38-киназы, ключевого компонента каскада митогенактивируемых протеинкиназ. Важно подчеркнуть, что в некоторых разделах материал в обзоре литературы излагается в историческом аспекте, и в нем должным образом отражен недооцененный вклад российских ученых в биологию стволовых клеток.

Замечание. На странице 30 указано, что киназы ATM, ATR и DNA-PK относятся к семейству фосфатидилинозитол-3-киназ, что не верно. Эти ферменты относятся к семейству «Phosphatidylinositol 3-kinase-related kinases» (PIKK), т.е. представляют собой серин/треониновые протеинкиназы с первичной структурой,

сходной с таковой фосфатидилинозитол-3-киназ. Это не одно и то же.

В разделе «Материал и методы исследования» подробно описаны методы культивирования клеток и их обработки перекисью водорода, методы проточной цитофлуориметрии, электрофореза, иммуноблоттинга, ОТ-ПЦР, иммунофлуоресценции, а также описаны используемые методы статистической обработки полученных результатов.

Замечание. Не совсем верно обозначение для буфера «0,1 М HEPES/NaOH, pH 7.4» – все-таки это натриевая соль HEPES-Na (стр. 43).

Замечание. В диссертации в подписях к различным рисункам N приводится равным от трех до шести. При этом в описании методики статистической обработки данных приведено только значение N=3.

Научная новизна, обоснованность и достоверность полученных результатов

Научная новизна исследования не вызывает сомнений, поскольку в качестве научных результатов диссертантом выдвинуты принципиально новые положения, каждое из которых обосновано и в полной мере подтверждается полученными автором результатами.

Автор впервые показал, что эМСК, в отличие от ЭСК, характеризуются более высокой устойчивостью к окислительному стрессу, вызываемому перекисью водорода, и в условиях воздействия высоких доз этого окислителя лишь небольшая часть популяции эМСК подвергается апоптозу. Таким образом, сделан важный вывод о том, что эМСК являются более устойчивыми к окислительному стрессу в сравнении с ЭСК. При изучении молекулярных механизмов апоптоза, вызванного перекисью водорода в эМСК и ЭСК, впервые установлено участие в них каспаз 3 и 8. Впервые показано, что в условиях сублетального окислительного стресса эМСК подвергаются преждевременному старению, причем процесс инициации старения опосредован активацией ответа на повреждение ДНК, приводящего к блокированию клеточного цикла через сигнальный путь ATM/Chk2/p53/p21/Rb. При этом процесс стабилизации старения, вызванного окислительным стрессом, функционально связан с

повышением продукции эндогенных активных форм кислорода вследствие увеличения функциональной активности митохондрий в ЭМСК и поддержания ответа на повреждение ДНК в постоянно активном состоянии. Впервые установлено, что в процессах инициации и развития старения участвует сигнальный путь, включающий ASK1/p38/MAPKAPK-2/Rb, который контролирует продукцию эндогенных активных форм кислорода. Основываясь на доказанной в работе роли окислительного стресса в инициации и развитии старения ЭМСК, предложены подходы для его предотвращения с помощью антиоксидантов (НАС) и ингибитора p38-киназы.

Выводы представлены корректно и грамотно сформулированы, полностью отражают полученные автором экспериментальные результаты и сделанные на их основе теоретические заключения.

Достоверность полученных автором результатов не вызывает сомнений. Об этом свидетельствует применение современных молекулярно-биологических, цитохимических и иммунохимических методов, в которых были использованы высоко специфичные антитела и праймеры, а также грамотно проведенная статистическая обработка результатов. Для этого был использован пакет программ Microsoft Excel и STATISTICA 10. При установлении достоверности различий данных, подчиняющихся нормальному распределению, использовали t-критерий Стьюдента и U-критерий Манна-Уитни.

Полученные результаты опубликованы в виде 11 печатных работ, в том числе 2 отечественных и 2 иностранных статей в журналах, рекомендованных ВАК для размещения материалов кандидатских диссертаций, а также широко представлялись на научных конференциях.

Практическое и теоретическое значение работы

Теоретическое значение диссертационной работы Бородкиной А.В. состоит в расшифровке молекулярных механизмов, лежащих в основе ответа эндометриальных стволовых клеток на стрессовые воздействия, вызванные нарушением окислительно-восстановительного баланса в этих клетках. Разработана схема преждевременного старения эндометриальных стволовых

клеток при их обработке перекисью водорода, которая включает быструю активацию ответа на повреждение ДНК и последующую передачу сигнала через p53/p21/Rb и p38/MK-2/Rb пути, что необходимо для установления необратимого блока клеточного цикла. Сделан принципиально важный вывод о том, что p38-киназа вовлечена в стабилизацию процесса старения и в основе этого лежит опосредованная ею регуляция внутриклеточной и митохондриальной продукции активных форм кислорода. Результаты исследований крайне важны для дальнейшего совершенствования репродуктивных технологий, в первую очередь процедуры экстракорпорального оплодотворения, поскольку окислительный стресс является одним из ключевых факторов снижения их эффективности. Автор предпринял попытки найти вещества с антиоксидантными свойствами, которые позволяют предотвратить такие негативные последствия окислительного стресса, как преждевременное старение клеток и их апоптоз. Полученные автором результаты могут быть также использованы в курсах лекций для студентов биологических и медицинских специальностей университетов и медицинских вузов.

Автореферат диссертационной работы Бородкиной А.В. в полной мере отражает основные результаты и выдвигаемые на их основе положения и соответствует требованиям ВАК РФ.

В целом диссертационная работа Бородкиной Александры Васильевны, несомненно, заслуживает положительной оценки. Принципиальных замечаний и возражений она не вызывает. По работе имеются ряд вопросов, которые не влияют на общую положительную оценку работы, но требуют разъяснения.

Вопросы и замечания по диссертационной работе

1. Почему для каждого типа стволовых клеток использовали свой набор концентраций перекиси водорода, что затрудняет сравнение цитотоксического действия этого реагента на различные типы клеток (рис. 9)? В частности, почему для ЭСК и фибробластов не приведены данные для 200 мкМ перекиси водорода, которая в дальнейшем использовать при изучении апоптоза и преждевременного

старения?

2. Не мог ли повлиять N-ацетилцистеин при одновременном внесении с перекисью водорода в культуру клеток на действующую концентрацию самой перекиси, особенно если учесть 50-ти кратный молярный избыток N-ацетилцистеина? В этом случае протекторный эффект весьма реакционноспособного N-ацетилцистеина может быть обусловлен его способностью изначально снижать концентрацию перекиси.

3. Почему в присутствии ингибиторов p38-киназы, особенно в случае BIRB, повышались уровень фосфорилирования p53-белка и содержание p21-белка, и одновременно с этим усиливалось фосфорилирование Rb-белка, если принять во внимание, что p21 является негативным регулятором фосфорилирования Rb (страница 96)? Фраза «по сравнению со стареющими клетками» (с. 95) – наверное, правильно – в стареющих клетках, там нет сравнения с необработанными эМСК. Почему полосы для p21-белка на рис. 69,д, дают отчетливые дублеты?

4. Почему не обсуждается возможная роль JNK-киназ в инициации старения эМСК, особенно в аспекте высокой эффективности неспецифического ингибитора SB, блокирующего как p38-, так и JNK-киназы, в сравнении с селективным ингибитором p38-киназы?

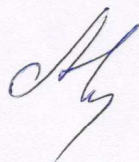
ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Бородкиной Александры Васильевны “Молекулярные механизмы ответов эндометриальных стволовых клеток человека на окислительный стресс” представляет собой самостоятельный научно-исследовательский труд, который посвящен актуальной проблеме изучения молекулярных механизмов ответа эндометриальных стволовых клеток человека на окислительный стресс. По актуальности, новизне поставленных и решенных задач, научному и практическому значению диссертационная работа Бородкиной Александры Васильевны “Молекулярные механизмы ответов эндометриальных стволовых клеток человека на окислительный стресс” полностью соответствует пункту 9

«Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденному постановлением правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г., а автор исследования достоин искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 — клеточная биология, цитология, гистология.

Отзыв обсужден и утвержден на заседании Лаборатории молекулярной эндокринологии и нейрехимии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук, протокол № 2 от «27» января 2015 года.

Заведующий лабораторией молекулярной эндокринологии и нейрехимии
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института эволюционной физиологии и биохимии
им. И.М. Сеченова Российской академии наук,
доктор биологических наук



Александр Олегович Шпаков

«30» января 2015 г.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт эволюционной физиологии и биохимии
им. И.М. Сеченова Российской академии наук,
пр. Тореца 44, 194223, Санкт-Петербург, Россия,
(812)552-31-88

www.iephb.ru



А.О. Шпаков
И.Т. Аверина
30.01.2015