

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА
Д 002.230.01 НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО
БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ НАУКИ ИНСТИТУТА ЦИТОЛОГИИ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
ПО ДИССЕРТАЦИИ **БОРОДКИНОЙ АЛЕКСАНДРЫ ВАСИЛЬЕВНЫ**
НА СОИСКАНИЕ УЧЁНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

Аттестационное дело № _____

Решение диссертационного совета от 27 февраля 2015 № 195/374

О присуждении **БОРОДКИНОЙ АЛЕКСАНДРЕ ВАСИЛЬЕВНЕ** (Россия)
учёной степени кандидата биологических наук

Диссертация **«МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ОТВЕТОВ
ЭНДОМЕТРИАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА НА
ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС»**

по специальности 03.03.04 – клеточная биология, гистология, цитология

принята к защите 12.12.2014 г., протокол № 189/368 Диссертационным советом Д 002.230.01, созданным на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт цитологии Российской академии наук, адрес: Тихорецкий проспект, д.4, Санкт-Петербург 194064, Россия, утверждён приказом Минобрнауки РФ № 105/нк от 11.04.2012 г.

Соискатель Бородкина Александра Васильевна, 1988 года рождения, в 2011 г. с отличием окончила факультет медицинской физики и биоинженерии Санкт-Петербургского государственного политехнического университета по специальности «Прикладные математика и физика» по

направлению «Прикладные математика и физика», с присвоением степени магистра. С 2008 по 2011 год работала старшим лаборантом-исследователем в лаборатории физиологии почки и водно-солевого обмена в Институте эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН. С **17.10.2011 по 17.10.2014** проходила очную аспирантуру Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института цитологии Российской академии наук. Диссертация выполнена в порядке прохождения аспирантуры.

Работает в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт цитологии РАН с 2011 года в Отделе внутриклеточной сигнализации и транспорта, с ноября 2014 года и по настоящее время Александра Васильевна является научным сотрудником.

Диссертация выполнена в Отделе внутриклеточной сигнализации и транспорта Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт цитологии РАН.

Научный руководитель – кандидат химических наук **БУРОВА ЕЛЕНА БОРИСОВНА**, старший научный сотрудник Отдела внутриклеточной сигнализации и транспорта Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт цитологии РАН.

Официальные оппоненты:

1. **БУРАВКОВА ЛЮДМИЛА БОРИСОВНА**, член-корреспондент Российской академии наук, доктор медицинских наук, профессор, заведующая лабораторией клеточной физиологии Федерального государственного бюджетного учреждения Государственный научный центр Российской Федерации Институт медико-биологических проблем Российской академии наук, Москва.

2. **КАНТИДЗЕ ОМАР ЛЕВАНОВИЧ**, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории структурно-функциональной организации хромосом Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биологии гена Российской академии наук, Москва.

- дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук (ИЭФБ РАН) (Санкт-Петербург), в своем положительном заключении (заключение составлено заведующим лабораторией молекулярной эндокринологии и нейрохимии ИЭФБ РАН, доктором биологических наук Шпаковым Александром Олеговичем и утверждено ВРИО директора ИЭФБ РАН академиком, профессором, доктором медицинских наук Н.П. Веселкиным) указала, что диссертационная работа представляет собой самостоятельный научно-исследовательский труд, посвященный актуальной проблеме изучения молекулярных механизмов ответов эндометриальных стволовых клеток человека на окислительный стресс, результаты представляют научно-практическую ценность, и соискатель заслуживает присуждения искомой степени, и

- дала положительный отзыв на диссертацию.

Соискатель имеет 11 опубликованных работ по теме диссертации, из них 4 статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК для размещения материалов кандидатских диссертаций, и 7 тезисов докладов.

Наиболее значимые работы по теме диссертации:

1. Бурова Е.Б., Люблинская О.Г., Шатрова А.Н., **Бородкина А.В.**, Никольский Н.Н. 2012. Сравнительный анализ устойчивости к окислительному стрессу стволовых клеток эндометрия и фибробластов человека. Цитология. 54(6) : 478–483. Статья посвящена исследованию устойчивости к окислительному стрессу эндометриальных стволовых клеток человека в сравнении с эмбриональными фибробластами легкого человека и дермальными фибробластами.
2. Burova E.B., **Borodkina A.V.**, Shatrova A.N., Nikolsky N.N. 2013. Sublethal oxidative stress induces the premature senescence of human mesenchymal stem cells derived from endometrium. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2013 : article ID 474931. В статье установлено, что сублетальные дозы H_2O_2 инициируют преждевременное старение эндометриальных стволовых клеток, тогда как более высокие дозы H_2O_2 индуцируют также и апоптоз в части клеточной популяции.
3. **Бородкина А.В.**, Шатрова А.Н., Пуговкина Н.А., Земелько В.И., Никольский Н.Н., Бурова Е.Б. 2013. Различные защитные механизмы эмбриональных и тканеспецифичных стволовых клеток человека в условиях окислительного стресса. Цитология. 55(8) : 517–526. Описанные в данной статье результаты свидетельствуют о том, что стволовые клетки человека различной природы в условиях окислительного стресса используют разные защитные механизмы: эмбриональные стволовые клетки быстро и эффективно элиминируют поврежденные клетки путем апоптоза, тогда как эндометриальные стволовые клетки подвергаются преждевременному старению.
4. **Borodkina A.V.**, Shatrova A.N., Abushik P.A., Nikolsky N.N., Burova E.B. 2014. Interaction between ROS dependent DNA damage, mitochondria and p38 MAPK underlies senescence of human adult stem cells. *Aging*. 6(6) : 481–495. В рамках данной статьи исследованы молекулярные механизмы, лежащие в основе стресс-индуцированного преждевременного старения эндометриальных стволовых клеток человека, а также оценена

возможность предотвращения развития старения в условиях подавления активности р38МАРК.

На диссертацию и автореферат поступили отзывы:

1. Доктора медицинских наук, менеджера компании «AstraZeneca» **Анисимова Сергея Владимировича**. Отзыв положительный без замечаний.
2. Заведующего лабораторией молекулярных механизмов биологической адаптации ИМБ РАН, профессора, доктора биологических наук **Михаила Борисовича Евгеньева**. Отзыв положительный без замечаний.
3. Заведующего лабораторией клеточного цикла Института молекулярной и клеточной биологии СО РАН, доктора биологических наук **Леонида Владимировича Омелянчука**. Отзыв положительный без замечаний.
4. Заведующей лабораторией молекулярной кардиологии ФГБУ СЗФМИЦ, кандидата биологических наук **Анны Борисовны Малашичевой**. Отзыв положительный без замечаний.
5. Ведущего научного сотрудника лаборатории генных и клеточных технологий факультета фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова, кандидата биологических наук, доцента **Наталии Игоревны Калининой**. Отзыв положительный, имеются критические замечания.

В качестве замечаний можно отметить присутствие англицизмов в тексте автореферата («десквамированном», с.3 автореферата; «сигналинг», с.21 автореферата). Кроме того, работа выполнена на линиях клеток, полученных в Институте цитологии РАН, однако в автореферате не приведены ссылки на работы, характеризующие эти линии (например, Земелько В.И. и соавт., 2011), что затрудняет интерпретацию данных. Также не приведена ссылка на сравнение стабильности кариотипа и пролиферативной активности ЭМСК и

МСК, полученных из других источников. Поскольку одним из важнейших механизмов участия МСК в регенерации тканей является способность этих клеток продуцировать биологически активные факторы, интересно было бы также включить в автореферат данные об изменении секреторной активности этих клеток в условиях оксидативного стресса. Данные замечания носят рекомендательный характер и не влияют на положительную оценку представленной работы. Автор заслуживает присвоения искомой степени по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология.

6. Заведующего лабораторией радиационной цитологии ИНЦ РАН, доктора биологических наук, профессора **Виктора Михайловича Михельсона** и старшего научного сотрудника лаборатории радиационной цитологии ИНЦ РАН, кандидата биологических наук, доцента **Ирины Михайловны Спивак**. Отзыв положительный без замечаний.
7. Заведующего лабораторией молекулярных основ дифференцировки клеток ИНЦ РАН, доктора биологических наук, профессора **Валерия Анатольевича Поспелова**. Отзыв положительный, имеются критические замечания.

Вместе с тем, в автореферате, и вероятно в самой диссертации, имеются некоторые недостатки. Так, авторы, анализируя устойчивость эМСК и ЭСК к окислительному стрессу, индуцированному действием H_2O_2 , приходят к выводу о большей устойчивости эМСК. При этом результаты сравнения в автореферате не представлены, что было бы желательно сделать хотя бы в самом докладе. Кроме того, читателю удобнее сравнивать эффект на эМСК и ЭСК при одних концентрациях перекиси водорода (Рис.1А). На Рис.1В уровень каспазы-3 и каспазы-8 на 24 ч после обработки клеток фактически нулевой. Означает ли это, что эти каспазы, как

нерасщепленная, так расщепленная формы, тотально деградируют? На Рис.4 и других, для анализа фосфорилированных форм ATM, Chk2 и p53 в качестве маркера нагрузки используется GAPDH, хотя правильно было бы использовать антитела на соответствующие нефосфорилированные формы. Однако отмеченные недостатки не отменяют общего хорошего впечатления о работе и не ставят под сомнение достоверность полученных результатов и сделанных на их основании выводов. Автор заслуживает присвоения искомой степени по специальности 03.03.04 - клеточная биология, цитология, гистология.

В дискуссии принимали участие:

1. Доктор биологических наук, профессор **В.А. Поспелов**, член Совета
2. Профессор, доктор биологических наук **Е.С. Корнилова**, член Совета
3. Доктор биологических наук **Б.В. Попов**, с.н.с. ИНЦ РАН
4. Профессор, доктор биологических наук **М.И. Мосевцкий**, член Совета
5. Кандидат биологических наук, доцент **И.М. Спивак**, с.н.с. ИНЦ РАН
6. Кандидат биологических наук, **О.В. Анацкая**, с.н.с. ИНЦ РАН
7. Доктор физико-математических наук **А.Л. Тимковский**, член Совета

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается высокой квалификацией выбранных специалистов в области клеточной биологии, в частности изучения сигнальных путей, лежащих в основе реакций клеток на различные типы стресса, для более объективной оценки полученных результатов, представленных в диссертации.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

разработана новая научная концепция молекулярных механизмов ответов эндометриальных стволовых клеток человека (эМСК) на окислительное воздействие, обогащающая существующее научное представление о реакциях стволовых клеток человека на различные виды стресса;

предложена оригинальная научная гипотеза о принципиальном различии ответов на окислительный стресс стволовых клеток различного происхождения, получившая экспериментальное подтверждение. Более чувствительные к действию H_2O_2 эмбриональные стволовые клетки человека (ЭСК) отвечали на любые дозы окислителя индукцией апоптоза, тогда как значительно более устойчивые эМСК в условиях сублетального окислительного воздействия подвергались преждевременному старению;

доказано существование двух последовательных стадий в развитии преждевременного старения эМСК: инициации и стабилизации. Стадия инициации опосредуется быстрым проникновением перекиси водорода (H_2O_2) в клетки и последующей индукцией ответа на повреждение ДНК, приводящей к блоку клеточного цикла через ATM/Chk2/p53/p21/Rb путь. Стадия стабилизации реализуется за счет петли положительной обратной связи между повышенной продукцией внутриклеточных активных форм кислорода (АФК), частично опосредованной модуляцией функционирования митохондрий, и постоянной активацией ответа на повреждение ДНК;

введены новые представления о вкладе в развитие стресс-индуцированного преждевременного старения эМСК сигнального пути ASK1/p38/MAPKAPK-2/Rb, митохондрий и эндогенных АФК.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

доказаны положения, вносящие вклад в расширение представлений о механизмах ответа стволовых клеток различного происхождения на окислительный стресс;

применительно к проблематике диссертации результативно использован комплекс современных методов молекулярной и клеточной биологии, включающих культивирование стволовых клеток, оценку жизнеспособности методом МТТ, проточную цитофлуориметрию, конфокальную микроскопию, иммунофлуоресцентный анализ, электрофорез и иммуноблотинг, выделение РНК, ПЦР, обратную транскрипцию, выявление активности SA- β -Gal, а также методы статистической обработки данных;

изложены новые экспериментальные факты о более высокой чувствительности к окислительному воздействию ЭСК по сравнению с эМСК и о вовлеченности стрессовой киназы p38 в регуляцию преждевременного старения эМСК;

раскрыты особенности реакций стволовых клеток разного происхождения в зависимости от дозы H_2O_2 . Показано, что большая часть ЭСК быстро подвергается апоптозу в ответ на действие окислителя в широком диапазоне концентраций, тогда как в эМСК апоптоз медленно развивается в небольшой части клеточной популяции лишь при действии высоких доз H_2O_2 . Выявлен каспаза-зависимый характер индукции апоптоза в стволовых клетках обоих типов. Ответы эМСК и ЭСК на действие H_2O_2 в сублетальной концентрации принципиально различаются: ЭСК отвечают индукцией апоптоза, тогда как эМСК подвергаются преждевременному старению;

изучены молекулярные механизмы, лежащие в основе преждевременного старения эМСК в условиях окислительного стресса;

проведена оценка возможности предотвращения преждевременного старения эМСК в условиях снижения уровня эндогенных АФК, а также ингибирования киназы p38.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:

разработаны и внедрены в практику научного исследования способы предотвращения стресс-индуцированного преждевременного старения эМСК

в условиях снижения уровня эндогенных АФК при помощи антиоксиданта НАС, а также в условиях специфического ингибирования киназной активности p38 MAPK;

определены перспективы возможного практического применения результатов исследования: для повышения эффективности применения эМСК в регенеративной медицине, в частности, для возможной коррекции фертильности женщин, основанной на принципах тканевой инженерии, и повышения их репродуктивной функции;

представлены новые данные, показывающие, важную роль стресс киназы p38 в процессе инициации и дальнейшей стабилизации преждевременного старения эМСК, а также в регуляции продукции эндогенных АФК и функционирования митохондрий в стареющих клетках.

Оценка достоверности результатов исследования выявила:

результаты, представленные в диссертации, получены на сертифицированном оборудовании, выбор использованных методов обоснован спецификой работы и поставленными в работе задачами, достоверность экспериментальных результатов оценена с помощью адекватных методов статистической обработки данных;

теория о возможности индукции преждевременного старения эМСК в условиях сублетального окислительного стресса, использованная в диссертационной работе, построена на известных и проверенных литературных фактах и данных об индукции преждевременного старения при различных стрессовых воздействиях в мезенхимных стволовых клетках, полученных из других источников, и согласуется с опубликованными экспериментальными данными по теме диссертации;

идея базируется на анализе современных литературных данных, а также на обобщении и анализе собственного экспериментального материала;

использовано сравнение авторских данных и данных, полученных ранее по рассматриваемой тематике;

установлено, что авторские результаты согласуются с результатами, представленными в независимых источниках по данной тематике, в тех случаях, когда такое сравнение было обоснованным;

использованы современные экспериментальные подходы (культивирование стволовых клеток, оценка жизнеспособности методом МТТ, проточная цитофлуориметрия, конфокальная микроскопия, иммунофлуоресцентный анализ, электрофорез и иммуноблоттинг, выделение РНК, ПЦР, обратная транскрипция, выявление активности SA- β -Gal) и адекватные методы статистической обработки результатов (с использованием компьютерных программ Microsoft Excel и STATISTICA 10).

Личный вклад соискателя состоит в:

непосредственном участии в планировании и проведении экспериментов, получении, обработке, анализе и интерпретации экспериментальных данных, полученных с помощью современных молекулярно-биологических методов. Автор принимал непосредственное участие в апробации результатов исследований на отечественных и зарубежных научных конференциях, в подготовке и написании статей и тезисов по теме диссертации.

Диссертация посвящена изучению молекулярных механизмов ответов эндометриальных стволовых клеток человека на окислительное воздействие и является оригинальным, законченным (в рамках поставленных задач) научно-квалификационным исследованием в области клеточной биологии, полностью отвечающим требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям (п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24 сентября 2013 года) по специальности 03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология.

На заседании 27.02.2015 г. Диссертационный совет решил присудить **БОРОДКИНОЙ АЛЕКСАНДРЕ ВАСИЛЬЕВНЕ** учёную степень кандидата биологических наук по специальности **клеточная биология, цитология, гистология**.

При проведении тайного голосования Диссертационный совет в количестве **22 человек**, из них **докторов по специальности** рассматриваемой диссертации (03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология) – **11**, участвовавших в заседании из 24 человек, входящих в состав совета, проголосовали:

«ЗА» - 22, «ПРОТИВ» – НЕТ, недействительных бюллетеней – НЕТ.

Председатель

Диссертационного совета Д002.230.01
Доктор биологических наук, профессор

Юдин А.Л.

Учёный секретарь

Диссертационного совета Д002.230.01
Кандидат биологических наук

Каминская Е.В.

«02» марта 2015

