

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

**о диссертационной работе Мироновой Екатерины Сергеевны на тему:
«Пептидергическая регуляция репликативного старения и нейрогенной
дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток человека»,
представленной к защите на соискание ученой степени кандидата
биологических наук по специальностям:
14.01.30 – геронтология и гериатрия;
03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология**

Актуальность темы диссертации

В последние десятилетия число пациентов с нейродегенеративными заболеваниями неуклонно растет, что, в первую очередь, связано с увеличением средней продолжительности жизни населения. К сожалению, в настоящий момент терапия нейродегенеративных заболеваний малоэффективна, существующие нейропротекторные препараты действуют лишь симптоматически, не влияя на течение патологического процесса. Одно из перспективных направлений для решения этой проблемы связано с развитием новых методов и подходов для нейротрансплантации стволовых клеток в поврежденную область головного мозга. Благодаря способности мезенхимальных стволовых клеток дифференцироваться в клетки различных типов, в частности в нейроны и глиальные клетки, данный подход является перспективной стратегией борьбы с нейродегенеративными и другими возраст-ассоциированными заболеваниями. Ключевую роль при трансплантации стволовых клеток играет создание условий для замедления процесса их старения. Поэтому важной задачей для практического применения стволовых клеток в медицине является выявление соединений, отсрочивающих потерю функциональных свойств и жизнеспособности этих клеток при культивировании. Известно, что некоторые короткие пептиды обладают способностью регулировать функциональную активность, пролиферацию, апоптоз и дифференцировку различных типов клеток. Однако молекулярные механизмы их эффектов на мезенхимальные стволовые клетки человека, в частности клетки, полученные из ткани десны или перидонтальной связки, остаются малоизученными.

В связи с этим диссертационное исследование Мироновой Е.С., которое посвящено изучению влияния коротких пептидов на репликативное старение и дифференцировку дентальных стволовых клеток человека в нейрогенном направлении, является актуальным и своевременно выполненным научным трудом.

Научная новизна результатов диссертационного исследования

В работе Мироновой Е.С. впервые установлено, что короткие пептиды, имеющие следующие аминокислотные последовательности: Ala-Glu-Asp-Gly (AEDG) и Lys-Glu-Asp (KED), замедляют репликативное старение клеток периодонтальной связки и мезенхимальных стволовых клеток десны человека в экспериментах *in vitro*, подавляя экспрессию генов и синтез белков p16 и p21 (белков, участвующих в регуляции клеточного цикла, взаимодействуя с циклин-зависимыми протеинкиназами) в исследованных культурах.

Кроме того, автором впервые показано, что пептиды AEDG и KED индуцируют дифференцировку клеток периодонтальной связки и мезенхимальных стволовых клеток десны человека в нейрогенном направлении, повышая экспрессию генов и синтез белков нестина, β -тубулина III, GAP43, даблкортина в исследованных культурах.

Практическая значимость диссертационного исследования

Исследование, проведенное Мироновой Е.С. по анализу влияния пептидов AEDG и KED на репликативное старение дентальных стволовых клеток в условиях *in vitro*, позволило установить, что изученные пептиды могут быть использованы в качестве дополнительных компонентов культуральных сред, применяемых для снижения уровня экспрессии генов белков, рассматриваемых как маркеры репликативного старения – p16, p21. Практическая значимость работы связана с получением результатов, подтверждающих, что исследуемые короткие пептиды могут обеспечить необходимую для клинического применения замедленную скорость старения клеток при их длительном культивировании.

Кроме того, автором установлена способность пептидов AEDG и KED модулировать экспрессию генов и биосинтез белков нейрогенеза (нестин, β -тубулин III, GAP43, даблкортин) в культурах дентальных стволовых клеток. Таким образом, исследованные пептиды могут быть рекомендованы в качестве средств, стимулирующих дифференцировку стволовых клеток в нейрогенном направлении. В ходе выполнения работы установлено, что индуцированные мезенхимальные мультипотентные стволовые клетки могут быть использованы в регенеративной медицине для нейротрансплантации в поврежденную область нервной системы с целью профилактики и лечения нейродегенеративных заболеваний, ассоциированных с возрастом.

Достоверность и обоснованность полученных результатов

Диссертационная работа Мироновой Е.С. является законченным научно-квалификационным исследованием. Автором получены новые приоритетные

данные о том, что пептиды AEDG и KED являются веществами, способными поддерживать морфологические особенности и функциональную активность мезенхимальных стволовых клеток, защищая их от репликативного старения при длительном культивировании, которое необходимо для осуществления клеточной терапии. Мироновой Е.С. также установлено, что пептиды AEDG и KED способны стимулировать дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток в нейрогенном направлении, что является одной из актуальных и перспективных задач клеточной геронтологии и нейротрансплантологии.

Миронова Е.С. применила в своей работе широкий набор методов молекулярной и клеточной биологии: культивирование клеток, проточный цитофлуориметрический анализ, индукция мезенгенной дифференцировки, гистологическое и иммунофлуоресцентное окрашивание, световая и лазерная сканирующая конфокальная микроскопия, морфометрия, метод полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Автор работы корректно выбрал и использовал методы статистической обработки полученных данных. Все вышесказанное, а также существенное количество публикаций по теме диссертации в рецензируемых отечественных и зарубежных журналах, подтверждают статистическую значимость и надежность полученных результатов.

Общая оценка структуры и содержания работы

Диссертационная работа Мироновой Е.С. построена по классической схеме и состоит из введения, обзора литературы, описания результатов исследований и их обсуждения, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Текст диссертации изложен на 112 страницах, содержит 6 таблиц, иллюстрирован 23 рисунками. Список литературы содержит 173 источников, из них отечественных – 36, зарубежных – 137; 79 источников представлены работами, опубликованными за последние 5 лет.

В разделе «Введение» обоснована актуальность исследования, его научная новизна, практическая и теоретическая значимость, поставлены цель и задачи работы, определены положения, выносимые на защиту. На мой взгляд, Положение № 2, выносимое на защиту, можно было бы объединить с Положением № 3, так как они повторяют сходные утверждения, касающиеся двух исследуемых пептидов.

Первая глава представлена обзором литературы на тему «Пептидная регуляция процессов репликативного старения, самообновления и потенции стволовых клеток» с подробным описанием особенностей мезенхимальных стволовых клеток и их роли в процессах репарации тканей. Приведены данные по биологической активности пептидов AEDG и KED.

Во второй главе дано подробное описание материалов и методов, в частности – методика культивирования стволовых клеток периодонтальной связки и мезенхимальных стволовых клеток десны человека, метод проточной цитофлуориметрии для выявления поверхностных антигенов стволовых клеток, метод индуцированной мезенгенной дифференцировки дентальных стволовых клеток для оценки их способности дифференцироваться в остеогенном и адипогенном направлениях; иммунофлуоресцентный анализ, метод полимеразной цепной реакции в режиме реального времени, а также методы статистической обработки полученных данных.

В третьей главе представлены результаты, подтверждающие наличие мезенхимального иммунофенотипа у культивируемых дентальных стволовых клеток, проведен анализ механизмов действия AEDG и KED на дентальные стволовые клетки в процессе их репликативного старения и нейрогенной дифференцировки. Результаты отражены на графиках и таблицах, хорошо проиллюстрированы микрофотографиями.

Раздел «Заключение» обобщает полученные результаты. Однако, по моему мнению, данный раздел длинноват, целесообразнее было бы большую часть этого материала выделить в отдельную главу «Обсуждение результатов исследования». В разделе «Заключение» имеется ряд повторов – несколько фраз, встречающихся и в других главах работы.

В целом, работа написана хорошим стилем, легко читается, отличается краткостью и четкостью изложения, хорошо иллюстрирована. Имеются малочисленные опечатки и неудачные стилистические обороты. Например, на стр. 30 написано, что «исследования ... обнаружили способность ... клеток дифференцироваться в нейроны и миоциты, обладающие повышенным интересом для регенеративной медицины» - наверно правильнее было бы писать о клетках, которые «вызывают интерес» с точки зрения применения в регенеративной медицине. Не совсем удачно словосочетание «лечение патологических процессов» на стр. 29 - уместнее было писать о «лечении заболеваний» или «коррекции нарушений при развитии того или иного патологического процесса». К счастью, подобные недочеты встречаются в рассматриваемой работе редко.

Выводы соответствуют положениям, выносимым на защиту, свидетельствуют о выполнении поставленных задач, написаны в лаконичной форме и хорошо дополняются практическими рекомендациями.

Автореферат достаточно полно отражает содержание диссертационной работы.

Мироновой Е.С. опубликовано 32 научные работы по материалам диссертации, в том числе 7 статей в журналах, рекомендованных ВАК Министерства науки и высшего образования РФ для материалов

диссертационных исследований (из них 4 статьи, индексируемые в Scopus и Web of Science), 1 глава в коллективной монографии, 1 статья в другом журнале и 23 тезиса докладов.

Использование результатов диссертационной работы в научной работе и учебном процессе

Диссертационная работа Мироновой Е.С. выполнена в рамках научной темы, соответствующей основному плану НИР АННО ВО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии». Результаты исследования также внедрены в практику ФГБУН «Институт физиологии им. И.П. Павлова» РАН.

Спорные и дискуссионные положения работы

Принципиальных замечаний по диссертационной работе Мироновой Е.С., а также спорных положений не имеется. В порядке дискуссии хотелось бы задать автору следующие вопросы:

1. В организме человека известно большое количество тканеисточников постнатальных стволовых клеток, почему автор в качестве материала для своего исследования остановил выбор на денальных стволовых клетках?
2. Одним из наиболее известных нейропротекторных пептидных препаратов является кортексин. По мнению автора, может ли кортексин оказывать влияние на старение и нейрональную дифференцировку стволовых клеток человека? Если да, то как это можно объяснить?
3. Каким образом подбиралась концентрация пептидов, в которой они вносились в культуры клеток?

Перечисленные вопросы имеют дискуссионный характер и не влияют на общую положительную оценку диссертационной работы Мироновой Е.С.

Заключение

Диссертационное исследование Мироновой Е.С. на тему «Пептидергическая регуляция репликативного старения и нейrogenной дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток человека», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, является законченным научно-квалификационным трудом. Диссертационная работа решает актуальную научно-практическую задачу современной молекулярной геронтологии и клеточной биологии. В диссертации содержатся результаты, раскрывающие молекулярные механизмы повышения репликативного потенциала мезенхимальных стволовых клеток, а также модуляции нейrogenеза пептидными субстанциями, что может найти

практическое применение при коррекции различных видов патологии нервной системы.

По актуальности, новизне, научной и практической значимости, объему проведенных исследований, углубленности анализа и обобщения материала рассматриваемая диссертация полностью соответствует требованиям п. 9 – 14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 г. (в редакции Постановления Правительства Российской Федерации № 335 от 21.04.2016 г., № 1168 от 01.10.2018 г.), предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени кандидата биологических наук, а ее автор – Миронова Екатерина Сергеевна – заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям: 14.01.30 – геронтология и гериатрия (биологические науки); 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология (биологические науки).

Официальный оппонент:

Заведующая отделом общей патологии и патологической физиологии
ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»
член-корреспондент РАН (Молекулярная медицина)
доктор биологических наук
(14.03.03 – патологическая физиология;
03.01.04 – биохимия),
доцент (03.01.04 – биохимия)

Шамова Ольга Валерьевна

«16» октябрь 2020 г.

Подпись чл.-корр. РАН, д.б.н., доц. О.В. Шамовой заверяю



Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины»

(ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»)

Почтовый адрес организации: 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д. 12.

Телефон/факс: +7(812)234-68-57/ +7(812)234-68-68

e-mail: shamova@iemspb.ru

web-сайт: <https://iemspb.ru/>



СОГЛАСИЕ НА ОППОНИРОВАНИЕ

диссертационной работы, защищаемой в диссертационном совете Д 521.103.01 при АННО ВО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии» по защите кандидатских и докторских диссертаций 197110, Санкт-Петербург, пр. Динамо, д. 3

Специальность диссертационного совета 14.01.30 – геронтология и гериатрия (биологические науки).

Я, Шамова Ольга Валерьевна, согласна быть официальным оппонентом по диссертации Мироновой Екатерины Сергеевны на тему: «Пептидергическая регуляция репликативного старения и нейрогенной дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток человека», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям: 14.01.30 – геронтология и гериатрия; 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология.


О себе сообщаю следующее:

1. Год рождения: 1964.
2. Гражданство: РФ.
3. Место работы: ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины».
4. Адрес места работы, телефон, должность: 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д. 12, +7(812)234-68-68, заведующая отделом общей патологии и патологической физиологии.
5. Ученая степень с указанием специальности: доктор биологических наук по специальностям: 14.03.03 – патологическая физиология; 03.01.04 – биохимия.
6. Ученое звание с указанием специальности: член-корреспондент РАН по специальности молекулярная медицина, доцент по специальности биохимия.
7. Список основных публикаций (9 работ за последние 5 лет):
 - 7.1. Umnyakova E.S., Zharkova M.S., Berlov M.N., Shamova O.V., Kokryakov V.N. Human antimicrobial peptides in autoimmunity // *Autoimmunity*. 2020. P. 1-11. DOI: 10.1080/08916934.2020.1711517.
 - 7.2. Zharkova M.S., Orlov D.S., Golubeva O.Yu., Chakchir O.B., Eliseev I.E., Grinchuk T.M., Shamova O.V. Application of antimicrobial peptides of the innate immune system in combination with conventional antibiotics – a novel way to combat antibiotic resistance? // *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2019. № 9(128). P. 1-23. DOI: 10.3389/fcimb.2019.00128.
 - 7.3. Eliseev I.E., Terterov I.N., Yudenko A.N., Shamova O.V. Linking sequence patterns and functionality of alpha-helical antimicrobial peptides // *Bioinformatics*. 2019. № 35(16). P. 2713-2717. DOI: 10.1093/bioinformatics/bty1048.
 - 7.4. Артамонов А.Ю., Сухарева М.С., Копейкин П.М., Сухачев А.Н., Филатенкова Т.А., Орлов Д.С., Шамова О.В. Эффекты пролин-богатых пептидов на функциональную активность лейкоцитов человека *in vitro* // *Российский иммунологический журнал*. 2019. Т. 13(22). №2. С. 710-713.

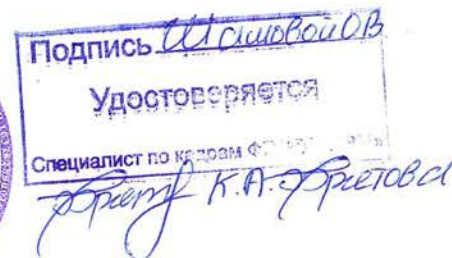
- 7.5. Panteleev P.V., Bolosov I.A., Kalashnikov A.A., Kokryakov V.N., Shamova O.V., Emelianova A.A., Balandin S.V., Ovchinnikova T.V. Combined antibacterial effects of goat cathelicidins with different mechanisms of action // *Frontiers in Microbiology*. 2018. № 9(2983). P. 1-19. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02983.
- 7.6. Жаркова М.С., Макарова Т.О., Орлов Д.С., Копейкин П.М., Орлов С.Б., Шамова О.В. Совместное антибактериальное действие *in vitro* пролин-богатого пептида слюны человека P-F (43-61) и катионных антимикробных пептидов // *Современные проблемы науки и образования*. 2018. № 6. DOI: 10.17513/spno.28281.
- 7.7. Баландин С.В., Емельянова А.А., Калашникова М.Б., Кокряков В.Н., Шамова О.В., Овчинникова Т.В. Молекулярные механизмы противоопухолевого действия природных антимикробных пептидов // *Биоорганическая химия*. 2016. Т. 42. № 6. С. 633-648.
- 7.8. Умнякова Е.С., Кудрявцев И.В., Грудинина Н.А., Баландин С.В., Болосов И.А., Пантелеев П.В., Филатенкова Т.А., Орлов Д.С., Цветкова Е.В., Овчинникова Т.В., Кокряков В.Н., Шамова О.В. Интернализация антимикробного пептида аципенсина 1 в опухолевые клетки человека // *Медицинская иммунология*. 2016. Т. 18. № 6. С. 581-588.
- 7.9. Пазина Т.Ю., Шамова О.В. Антимикробные пептиды животного происхождения модулируют функциональную активность естественных киллерных клеток // *Российский иммунологический журнал*. 2015. Т. 9(18). № 2-1. С. 30-32.

Член-корреспондент РАН,

доктор биологических наук, доцент


(Подпись)

Ольга Валерьевна Шамова



«11» 09 2020 г.

СВЕДЕНИЯ ОБ ОФИЦИАЛЬНОМ ОППОНЕНТЕ

по диссертации Мироновой Екатерины Сергеевны на тему: «Пептидергическая регуляция репликативного старения и нейрогенной дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток человека», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям: 14.01.30 – геронтология и гериатрия; 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология
(197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д. 12, oshamova@yandex.ru)

ФИО	Год рождения, гражданство	Место основной работы, должность	Ученая степень, специальность	Ученое звание	Основные работы
1	2	3	4	5	6
Шамова Ольга Валерьевна	1964 г., РФ	Заведующая отделом общей патологии и патологической физиологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»	Доктор биологических наук по специальностям: 14.03.03 – патологическая физиология; 03.01.04 – биохимия	Член-корреспондент РАН по специальности молекулярная медицина, доцент по специальности биохимия	<ol style="list-style-type: none"> Umnyakova E.S., Zharkova M.S., Berlov M.N., Shamova O.V., Kokryakov V.N. Human antimicrobial peptides in autoimmunity // Autoimmunity. 2020. P. 1-11. DOI: 10.1080/08916934.2020.1711517. Zharkova M.S., Orlov D.S., Golubeva O.Yu., Chakchir O.B., Eliseev I.E., Grinchuk T.M., Shamova O.V. Application of antimicrobial peptides of the innate immune system in combination with conventional antibiotics – a novel way to combat antibiotic resistance? // Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 2019. № 9(128). P. 1-23. DOI: 10.3389/fcimb.2019.00128. Eliseev I.E., Terterov I.N., Yudenko A.N., Shamova O.V. Linking sequence patterns and functionality of alpha-helical antimicrobial peptides // Bioinformatics. 2019. № 35(16). P. 2713-2717. DOI: 10.1093/bioinformatics/bty1048. Артамонов А.Ю., Сухарева М.С., Копейкин П.М., Сухачев А.Н., Филатенкова Т.А., Орлов

					<p>Д.С., Шамова О.В. Эффекты пролин-богатых пептидов на функциональную активность лейкоцитов человека <i>in vitro</i> // Российский иммунологический журнал. 2019. Т. 13(22). №2. С. 710-713.</p> <p>5. Panteleev P.V., Bolosov I.A., Kalashnikov A.A., Kokryakov V.N., Shamova O.V., Emelianova A.A., Balandin S.V., Ovchinnikova T.V. Combined antibacterial effects of goat cathelicidins with different mechanisms of action // <i>Frontiers in Microbiology</i>. 2018. № 9(2983). P. 1-19. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02983.</p> <p>6. Жаркова М.С., Макарова Т.О., Орлов Д.С., Копейкин П.М., Орлов С.Б., Шамова О.В. Совместное антибактериальное действие <i>in vitro</i> пролин-богатого пептида слюны человека P-F (43-61) и катионных антимикробных пептидов // <i>Современные проблемы науки и образования</i>. 2018. № 6. DOI: 10.17513/spno.28281.</p> <p>7. Баландин С.В., Емельянова А.А., Калашникова М.Б., Кокряков В.Н., Шамова О.В., Овчинникова Т.В. Молекулярные механизмы противоопухолевого действия природных антимикробных пептидов // <i>Биоорганическая химия</i>. 2016. Т. 42. № 6. С. 633-648.</p> <p>8. Умнякова Е.С., Кудрявцев И.В., Грудинина Н.А., Баландин С.В., Болосов И.А., Пантелеев П.В., Филатенкова Т.А., Орлов Д.С., Цветкова Е.В., Овчинникова Т.В., Кокряков В.Н., Шамова О.В. Интернализация антимикробного пептида аципенсина 1 в опухолевые клетки человека //</p>
--	--	--	--	--	--

				<p>Медицинская иммунология. 2016. Т. 18. № 6. С. 581-588.</p> <p>9. Пазина Т.Ю., Шамова О.В. Антимикробные пептиды животного происхождения модулируют функциональную активность естественных киллерных клеток // Российский иммунологический журнал. 2015. Т. 9(18). № 2-1. С. 30-32.</p>
--	--	--	--	---

Ученый секретарь Ученого совета
 ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»
 доктор биологических наук



Н.Н. Пшенкина

Подпись *Григорьевой Г.А.*
 Удостоверяется
 Нач. отдела УП и Д ФГБНУ «ИЭМ»



Владарова О.В.

« 11 » 09 2020 г.

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

о диссертационной работе Мироновой Екатерины Сергеевны на тему:
«Пептидергическая регуляция репликативного старения и нейрогенной
дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток человека»,
представленной к защите на соискание ученой степени кандидата
биологических наук по специальностям:
14.01.30 – геронтология и гериатрия;
03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Актуальность темы диссертации

Старение можно рассматривать как процесс, в котором пул эндогенных стволовых клеток с возрастом прогрессивно утрачивает свою способность замещать поврежденные и вступившие в апоптоз клетки. Почти для всех живых организмов зависимое от времени угасание регенеративного потенциала стволовых клеток определяет предрасположенность к старению и ряду возраст-ассоциированных заболеваний, таких как нейродегенеративные. Генерация новых нейронов из стволовых клеток, могла бы стать перспективным вариантом лечения для пациентов с возрастной патологией нервной системы. Тем не менее, длительное культивирование стволовых клеток в условиях *in vitro*, крайне необходимое для клинического применения, вызывает потерю клеточных функций. Сложность процесса старения обуславливает потребность в новых подходах к прояснению и регулированию его многофакторных механизмов.

В связи с этим, целью диссертационной работы Е.С. Мироновой явилось исследование влияния коротких пептидов AEDG и KED на репликативное старение и дифференцировку дентальных стволовых клеток человека в нейрогенном направлении. В качестве маркеров репликативного старения автором были выбраны сигнальные молекулы p16, p21, а в качестве маркеров нейрогенеза – нестин, β -тубулин III, GAP43, даблкортин. В задачи автора входило проведение фенотипирования стволовых клеток периодонтальной связки и мезенхимальных стволовых клеток десны человека, а также изучение влияния пептидов AEDG и KED на экспрессию генов и синтез белков репликативного старения (p16, p21) и нейрогенеза (нестин, β -тубулин III, GAP43, даблкортин) в стволовых клетках периодонтальной связки и мезенхимальных стволовых клетках десны человека. Изучение экспрессии генов и синтез белков проводились с использованием современных методов молекулярной биологии, что делает диссертационную работу Е.С. Мироновой качественно продуманным и

актуальным исследованием.

Научная новизна результатов диссертационного исследования

Е.С. Мироновой была продемонстрирована способность пептидов AEDG и KED влиять на процесс репликативного старения денальных стволовых клеток. Установлено, что пептиды AEDG и KED замедляют репликативное старение клеток периодонтальной связки и мезенхимальных стволовых клеток десны человека в условиях *in vitro*, снижая экспрессию генов и синтез белков p16 и p21 в исследованных культурах.

Автором также впервые изучена способность пептидов AEDG и KED влиять на нейрогенез денальных стволовых клеток. Установлено, что пептиды AEDG и KED индуцируют дифференцировку клеток периодонтальной связки и мезенхимальных стволовых клеток десны человека в нейрогенном направлении *in vitro*, повышая экспрессию генов и синтез белков нестина, β -тубулина III, GAP43, даблкортина в исследованных культурах.

Практическая значимость диссертационного исследования

Благодаря результатам диссертационного исследования Е.С. Мироновой появилось обоснование возможности использования пептидов в качестве дополнительных веществ в культуральных средах с целью задержки экспрессии маркеров репликативного старения p16, p21 и стимулирования широкомасштабной экспансии мезенхимальных мультипотентных стволовых клеток *in vitro*. Автором продемонстрировано, что пептиды могут обеспечить необходимую для клинического применения низкую степень старения клеток при их длительном культивировании.

Кроме того, Е.С. Миронова установила способность пептидов AEDG и KED увеличивать экспрессию генов и синтез белков нейрогенеза (нестин, β -тубулин III, GAP43, даблкортин) в культурах денальных стволовых клеток. Таким образом изученные пептиды могут быть рекомендованы в качестве средств, стимулирующих дифференцировку стволовых клеток в нейрогенном направлении. Индуцированные мезенхимальные мультипотентные стволовые клетки могут быть использованы в регенеративной медицине для нейротрансплантации в поврежденную область нервной системы с целью профилактики и лечения нейродегенеративных заболеваний, ассоциированных с возрастом.

Достоверность и обоснованность полученных результатов

Диссертационное исследование Е.С. Мироновой является логически спланированным, завершенным научным исследованием, направленным на

решение актуальной задачи современной молекулярной геронтологии – изучение молекулярных механизмов действия коротких пептидов AEDG и KED на процессы репликативного старения и нейрогенной дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток в условиях *in vitro*.

Для достижения поставленной цели соискатель использовала метод культивирования клеток, проточный цитофлуориметрический анализ, индукцию мезенхимной дифференцировки, гистологическое и иммунофлуоресцентное окрашивание, световую и лазерную сканирующую конфокальную микроскопию, морфометрию, полимеразную цепную реакцию в режиме реального времени с реакцией обратной транскрипции. Е.С. Миронова также принимала участие в анализе данных, статистической обработке полученных результатов исследования, написании статей, главы в монографии, тезисов, выступлениях с докладами на международных и отечественных конференциях.

Общая оценка структуры и содержания работы

Диссертационное исследование Е.С. Мироновой состоит из введения, обзора литературы, описания результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций и указателя литературы. Текст диссертации изложен на 112 страницах, содержит 6 таблиц, иллюстрирован 23 рисунками. Список литературы содержит 173 источников, из них на русском языке – 36, на английском – 137. Тщательный анализ такого широкого списка публикаций позволил автору глубоко вникнуть в суть описываемой в диссертации научной области, а соответствующие главы с используемыми ссылками на приведенные работы логично резюмируют изложение собственных результатов.

Текст диссертации Е.С. Мироновой написан лаконичным литературным языком, легко читается. Материал иллюстрирован высококачественными микрофотографиями и графиками, которые облегчают анализ описываемых результатов. Работа выполнена на высоком научном и методическом уровне, диссертация оформлена в соответствии с требованиями, предъявляемыми к научному изданию.

По материалам диссертации написаны 32 научные работы, в том числе 7 статей в журналах, рекомендованных ВАК Министерства науки и высшего образования РФ для опубликования материалов диссертационных исследований (из них 4 статьи, индексируемые в Scopus и Web of Science), 1 глава в коллективной монографии, 1 статья в другом журнале и 23 тезиса докладов.

Автореферат полностью отражает содержание диссертационной

работы, а выводы соответствуют поставленным задачам.

Использование результатов диссертационной работы в научной работе и учебном процессе

Диссертационная работа Е.С. Мироновой является темой, выполняемой по основному плану научно-исследовательских работ АННО ВО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии». Результаты исследования также нашли свое применение в научно-исследовательской работе ФГБУН «Институт физиологии им. И.П. Павлова» РАН.

Спорные и дискуссионные положения работы

Принципиальных замечаний и спорных положений в работе Е.С. Мироновой не имеется. В порядке обсуждения хотелось бы задать соискателю несколько вопросов:

1. Известно, что в Санкт-Петербургском институте биорегуляции и геронтологии разработано большое количество коротких пептидов. Почему в своей работе Вы изучали именно пептиды AEDG и KED?
2. Почему Вами была выбрана концентрация пептидов 10 нг/мл? Этот выбор основывался на предварительно проведенных экспериментах или данных литературы?

Эти вопросы ни в коем случае не влияют на высокую положительную оценку диссертационного исследования.

Заключение

Диссертационная работа Е.С. Мироновой «Пептидергическая регуляция репликативного старения и нейрогенной дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток человека», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, является самостоятельно выполненным завершенным научным квалификационным исследованием.

В работе решена актуальная научно-практическая задача современной клеточной геронтологии – изучено влияние коротких пептидов AEDG и KED на репликативное старение в культурах дентальных стволовых клеток при их старении пассажами. Кроме того, автором исследовано влияние коротких пептидов в отношении индуцированной нейрогенной дифференцировки дентальных стволовых клеток.

По своей актуальности, научной новизне, объёму выполненных исследований и практической значимости полученных результатов представленная работа соответствует требованиям п. 9 – 14 «Положения о

порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 г. (в редакции Постановления Правительства Российской Федерации № 335 от 21.04.2016 г., № 1168 от 01.10.2018 г.), предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени кандидата биологических наук, а ее автор – Екатерина Сергеевна Миронова – несомненно заслуживает присуждения ей ученой степени кандидата биологических наук по специальностям: 14.01.30 – геронтология и гериатрия; 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология.

Официальный оппонент:

заведующая кафедрой фармакологии,
организации и экономики фармации Медицинского института;
заведующая лабораторией доклинических исследований,
клеточной патологии и биорегуляции Института высоких
биомедицинских технологий ФГБОУ ВО
«Петрозаводский государственный университет»
доктор медицинских наук
(14.01.30 – геронтология и гериатрия),
профессор по кафедре фармакологии, организации и экономики фармации
(14.00.25 – фармакология, клиническая фармакология)

Виноградова Ирина Анатольевна

«26» октября 2020 г.

Подпись д.м.н., проф. И.А. Виноградовой за

Подпись руки	<i>Виноградова Ирина Анатольевна</i>
УДОСТОВЕРЯЮ.	
Уч. секретарь ученого совета	<i>Девешишвили Л. А.</i>
	«26» октября 2020 г.



Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Петрозаводский государственный университет»
(ФГБОУ ВО «Петрозаводский государственный университет»)

Почтовый адрес организации: 185910, Россия, Республика Карелия, г. Петрозаводск, пр. Ленина, д. 33.

Телефон/факс: +7(814-2)71-10-29 / +7(814-2)71-10-00.

e-mail: irinav@petrsu.ru

web-сайт: <http://www.petrsu.ru>

СОГЛАСИЕ НА ОППОНИРОВАНИЕ

диссертационной работы, защищаемой в диссертационном совете Д 521.103.01 при АННО ВО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии» по защите кандидатских и докторских диссертаций
197110, Санкт-Петербург, пр. Динамо, д. 3

Специальность диссертационного совета 14.01.30 – геронтология и гериатрия (биологические науки).

Я, Виноградова Ирина Анатольевна, согласна быть официальным оппонентом по диссертации Мироновой Екатерины Сергеевны на тему: «Пептидергическая регуляция репликативного старения и нейрогенной дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток человека», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям: 14.01.30 – геронтология и гериатрия; 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология.

О себе сообщаю следующее:

1. Год рождения: 1963.
2. Гражданство: РФ.
3. Место работы: ФГБОУ ВО «Петрозаводский государственный университет».
4. Адрес места работы, телефон, должность: 185910, Республика Карелия, г. Петрозаводск, пр. Ленина, д. 33, +7(8142)71-10-29, заведующая кафедрой фармакологии, организации и экономики фармации.
5. Ученая степень с указанием специальности: доктор медицинских наук по специальности 14.01.30 – геронтология и гериатрия.
6. Ученое звание с указанием специальности: профессор по кафедре фармакологии, организации и экономики фармации (14.00.25 – фармакология, клиническая фармакология)
7. Список основных публикаций (7 работ за последние 5 лет):
 - 7.1. Виноградова И.А., Юнаш В.Д. Влияние светового режима и препаратов эпифиза на физическую работоспособность крыс при старении. – Петрозаводск: ПетрГУ, 2016. – 68 с.
 - 7.2. Жукова О.В., Обухова Е.С., Хижкин Е.А., Илюха В.А., Виноградова И.А. Лузиндол ускоряет старение эстральной функции у самок крыс // Успехи геронтологии. 2016. Т. 29. №. 2. С. 279-285.
 - 7.3. Лесонен А.С., Виноградова И.А., Лоскутова Е.Е. Доступность противоаллергических антигистаминных лекарственных препаратов для потребителей старших возрастных групп // Успехи геронтологии. 2017. Т. 130. № 1. С. 138-142.
 - 7.4. Лотош Т.А., Виноградова И.А. Световое загрязнение, параметры биологического возраста и продолжительность жизни. – Петрозаводск: ПетрГУ, 2015. – 67 с.
 - 7.5. Хижкин Е.А., Илюха В.А., Виноградова И.А., Антонова Е.П., Морозов А.В. Циркадные ритмы активности антиоксидантных ферментов у молодых и

взрослых крыс в условиях световой депривации // Успехи геронтологии. 2018. Т. 31. № 2. С. 211-222.

- 7.6. Хижкин Е.А., Сергина С.Н., Илюха В.А., Виноградова И.А. Роль мелатонина в регуляции возрастных изменений антиоксидантных ферментов у млекопитающих. – Петрозаводск: ПетрГУ, 2016. – 85 с.
- 7.7. Khizhkin E., Ilyukha V., Vinogradova I., Uzenbaeva L., Ilyina T., Yunash V., Morozov A., Anisimov V. Physiological and biochemical mechanisms of lifespan regulation in rats kept under various light // Current Aging Science. 2017. Т. 10. № 1. С. 49-55.

Доктор медицинских наук, профессор _____  Ирина Анатольевна Виноградова
(Подпись)

Подпись д.м.н., проф. И.А. Виноградовой заверяю



Мышина Е. Ю.
14. 09 2020 г.

«14» 09 2020 г.

СВЕДЕНИЯ ОБ ОФИЦИАЛЬНОМ ОППОНЕНТЕ

по диссертации Мироновой Екатерины Сергеевны на тему: «Пептидергическая регуляция репликативного старения и нейрогенной дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток человека», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям: 14.01.30 – геронтология и гериатрия; 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология (185910, Россия, Республика Карелия, г. Петрозаводск, пр. Ленина, д. 33, iri89569627@yandex.ru)

ФИО	Год рождения, гражданство	Место основной работы, должность	Ученая степень, специальность	Ученое звание	Основные работы
1	2	3	4	5	6
Виноградова Ирина Анатольевна	1963 г., РФ	Заведующая кафедрой фармакологии, организации и экономики фармации Медицинского института; заведующая лабораторией доклинических исследований, клеточной патологии и биорегуляции Института высоких биомедицинских технологий ФГБОУ ВО «Петрозаводский государственный университет»	Доктор медицинских наук по специальности 14.01.30 – геронтология и гериатрия	Профессор по кафедре фармакологии, организации и экономики фармации (14.00.25 – фармакология, клиническая фармакология)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Виноградова И.А., Юнаш В.Д. Влияние светового режима и препаратов эпифиза на физическую работоспособность крыс при старении. – Петрозаводск: ПетрГУ, 2016. – 68 с. 2. Жукова О.В., Обухова Е.С., Хижкин Е.А., Илюха В.А., Виноградова И.А. Лузиндол ускоряет старение эстральной функции у самок крыс // Успехи геронтологии. 2016. Т. 29. №. 2. С. 279-285. 3. Лесонен А.С., Виноградова И.А., Лоскутова Е.Е. Доступность противоаллергических антигистаминных лекарственных препаратов для потребителей старших возрастных групп // Успехи геронтологии. 2017. Т. 130. № 1. С. 138-142. 4. Лотош Т.А., Виноградова И.А. Световое загрязнение, параметры биологического возраста и продолжительность жизни. – Петрозаводск: ПетрГУ, 2015. – 67 с. 5. Хижкин Е.А., Илюха В.А., Виноградова И.А., Антонова Е.П., Морозов А.В. Циркадные ритмы активности антиоксидантных ферментов у молодых и взрослых крыс в условиях световой

					<p>депривации // Успехи геронтологии. 2018. Т. 31. № 2. С. 211-222.</p> <p>6. Хижкин Е.А., Сергина С.Н., Илюха В.А., Виноградова И.А. Роль мелатонина в регуляции возрастных изменений антиоксидантных ферментов у млекопитающих. – Петрозаводск: ПетрГУ, 2016. – 85 с.</p> <p>7. Khizhkin E., Pyukha V., Vinogradova I., Uzenbaeva L., Ilyina T., Yunash V., Morozov A., Anisimov V. Physiological and biochemical mechanisms of lifespan regulation in rats kept under various light // Current Aging Science. 2017. Т. 10. № 1. С. 49-55.</p>
--	--	--	--	--	--

Проректор по НИР

ФГБОУ ВО «Петрозаводский государственный университет»

«14» сентября 2020 г.



В. С. Сюнёв