

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ЭКСПЕРТНОЙ КОМИССИИ

диссертационного совета Д 521.103.01 при АННО ВО НИЦ
«Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии»
по диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук
Мироновой Екатерины Сергеевны на тему: «Пептидергическая регуляция
репликативного старения и нейрогенной дифференцировки мезенхимальных
стволовых клеток человека»

Для рассмотрения работы Е.С. Мироновой была создана комиссия из членов диссертационного совета в составе: з.д.н. РФ, д.м.н., проф. Г.А. Рыжак (председатель); з.д.н. РФ, д.м.н., проф. И.М. Кветной; д.б.н., проф. Н.И. Чалисова.

Комиссия ознакомилась с диссертацией и представленными документами.

Работа выполнена в лаборатории молекулярных механизмов старения отдела биogerонтологии Автономной научной некоммерческой организации высшего образования Научно-исследовательский центр «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии» (АННО ВО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии») при участии научных руководителей з.д.н. РФ, чл.-корр. РАН, д.м.н., проф. В.Х. Хавинсона и д.б.н., доц. Н.С. Линьковой.

Диссертация была апробирована 27 марта 2020 г. протокол № 3 на совместном заседании отделов биogerонтологии, клеточной биологии и патологии, клинической геронтологии и гериатрии АННО ВО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии» и рекомендована к защите в Диссертационном совете Д 521.103.01 по защите докторских и кандидатских диссертаций по специальностям: 14.01.30 – геронтология и гериатрия; 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология.

Актуальность исследования. С возрастом снижается количество мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК), регулирующих физиологическое обновление тканей и поддержание гомеостаза в организме человека, что впоследствии нарушает его функционирование. ММСК широко используются в регенеративной медицине в том числе при возраст-ассоциированных нейродегенеративных заболеваниях. Генерация новых нейронов из стволовых клеток, может стать перспективным вариантом лечения для пациентов с патологией нервной системы.

Длительное культивирование стволовых клеток в условиях *in vitro* вызывает потерю клеточных функций. ММСК переходят в состояние

репликативного старения и становятся непригодными для клинического применения, в котором необходимо использовать большое число клеток с целью регенерации тканей и органов. ММСК человека, полученные из периодонтальной связки (PDLSCs) и десны (GMSCs), обладают высокой пролиферативной способностью, гомогенностью и стабильным фенотипом. PDLSCs и GMSCs относят к ММСК в соответствии с критериями Международного общества клеточной терапии, согласно которым мезенхимальные свойства клеток могут быть идентифицированы по их способности адгезироваться к лабораторному пластику, дифференцироваться при индукции в остеогенном и адипогенном направлении *in vitro*, а также экспрессировать на своей поверхности основную панель специфических для ММСК маркеров: CD13 (миелоидный гликопротеин), CD29 (интегрин β -1), CD44 (рецептор лимфоцитов), CD73 (Т- и В-клеточный маркер), CD90 (Т-клеточный маркер), CD105 (маркер ангиогенеза), но при этом не содержать маркеры гемопоэтических стволовых клеток: CD14 (рецептор липополисахаридов), CD34 (маркер гемопоэза, молекула клеточной адгезии), CD45 (маркер лейкоцитов) или CD11b (маркер клеток миелопоэза), CD79a (В-клеточный маркер) или CD19 (ко-рецептор В-лимфоцитов) и HLA-DR (лейкоцитарный антиген человека, молекула главного комплекса гистосовместимости II класса).

Короткие олигопептиды являются сигнальными молекулами, способными взаимодействовать с ДНК и гистонами, эпигенетически регулировать экспрессию генов и синтез белков, обеспечивая поддержание гомеостаза клеток, тканей и органов при их старении. Тетрапептид AEDG (Ala-Glu-Asp-Gly) индуцирует активность каталитической субъединицы теломеразы и модулирует длину теломер в культуре фибробластов легкого и лимфоцитах крови человека, ингибирует синтез каспазы-3 (белок апоптоза), MMP9, CD98hc (белки старения и дисфункции клеток), повышает синтез Ki67 (пролиферативный белок) в культурах фибробластов кожи при их репликативном старении. Пептид AEDG индуцирует деконденсацию гетерохроматина вблизи центромер в лимфоцитах крови у лиц пожилого и старческого возраста, способствует увеличению продолжительности жизни *in vivo*. Трипептид KED (Lys-Glu-Asp) обладает вазопротекторной активностью в культурах эндотелия при старении, которая была реализована посредством эпигенетической регуляцией повышения синтеза Ki67 и понижения синтеза p53. Пептид способствует восстановлению синаптической передачи при нейродегенерации, повышая количество грибовидных шипиков в культурах нейронов гиппокампа в модели болезни Альцгеймера у мышей, а также стимулирует экспрессию серотонина в культурах клеток коры головного мозга при их старении.

Таким образом, пептиды AEDG и KED являются потенциальными веществами, способными поддерживать морфологию и функциональную активность ММСК, защищая клетки от репликативного старения при их длительном культивировании, которое необходимо для клеточной терапии. Предполагается, что пептиды AEDG и KED способны регулировать дифференцировку ММСК в нейрогенном направлении, что является одной из актуальных и перспективных областей клеточной геронтологии и нейротрансплантологии.

Наиболее значимые результаты, полученные в работе. Используемые в исследовании клеточные культуры стволовых клеток периодонтальной связки и мезенхимальных стволовых клеток десны человека обладают иммунофенотипом мезенхимальных мультипотентных стволовых клеток (позитивны в отношении молекул CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 и негативны в отношении гемопоэтических поверхностных молекул CD14, CD34 и CD45), а также способностью к мезенхимной дифференцировке, что соответствует минимальным необходимым и достаточным критериям, принятым международным сообществом по клеточной терапии.

Пептид AEDG статистически значимо снижает экспрессию генов и синтез белков репликативного старения p16 и p21 в стволовых клетках периодонтальной связки и в мезенхимальных стволовых клетках десны человека. Пептид AEDG стимулирует экспансию мезенхимальных стволовых клеток *in vitro* и замедляет их репликативное старение.

Пептид KED статистически значимо снижает экспрессию генов и синтез белков p16 и p21 в стволовых клетках периодонтальной связки и в мезенхимальных стволовых клетках десны человека. Пептид KED стимулирует экспансию мезенхимальных стволовых клеток *in vitro* и замедляет их репликативное старение.

Пептид AEDG статистически значимо повышает экспрессию генов и синтез белков нейрогенеза: нестин, β -тубулин III, GAP43, даблкортин в стволовых клетках периодонтальной связки и в мезенхимальных стволовых клетках десны человека. Пептид AEDG способен индуцировать дифференцировку дентальных стволовых клеток в нейрогенном направлении посредством повышения экспрессии генов и синтеза белков, ответственных за нейрогенез.

Пептид KED статистически значимо повышает экспрессию генов и синтез белков: нестин, β -тубулин III, GAP43, даблкортин в стволовых клетках периодонтальной связки и в мезенхимальных стволовых клетках десны человека. Пептид KED способен индуцировать дифференцировку дентальных

стволовых клеток в нейрогенном направлении посредством повышения экспрессии генов и синтеза белков, ответственных за процесс нейрогенеза.

Достоверность работы обеспечена достаточным объемом экспериментальных исследований высокого уровня, применением адекватных поставленным задачам современных методов исследования: метод выделения первичных культур дентальных стволовых клеток, метод иммунофлуоресцентного исследования, проточной цитофлуориметрии, лазерной сканирующей конфокальной и световой микроскопии, полимеразной цепной реакции в режиме реального времени и методов статистической обработки полученных данных.

Новизна работы. В работе впервые изучена способность пептидов AEDG и KED влиять на процесс репликативного старения дентальных стволовых клеток. Автором 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.

В работе Е.С. Мироновой впервые изучена способность пептидов AEDG и KED влиять на нейрогенез дентальных 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.

Теоретическая значимость. На основе проведенного Е.С. Мироновой исследования объяснен молекулярный механизм пептидной регуляции репликативного старения стволовых клеток в условиях *in vitro*. При старении стволовых клеток повышается экспрессия мРНК транскриптов генов *p16* и *p21*, повышается синтез соответствующих белков, играющих ключевую роль в процессах клеточного цикла и старения. Тем не менее, пептиды AEDG и KED статистически значимо снижают экспрессию генов и синтез белков репликативного старения p16 и p21 в культурах дентальных стволовых клеток. Таким образом, пептидная регуляция может являться одним из физиологических механизмов поддержания пула стволовых клеток в организме за счет регуляции их клеточного цикла.

Практическая значимость. Исследование 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 веществ в культуральных средах с целью задержки экспрессии маркеров репликативного старения p16, p21 и стимулирования

широкомасштабной экспансии мезенхимальных мультипотентных стволовых клеток *in vitro*. Практическая значимость работы состоит в том, что пептиды могут обеспечить необходимую для клинического применения низкую степень старения клеток при их длительном культивировании.

Кроме того, автором установлена способность пептидов AEDG и KED увеличивать экспрессию генов и синтез белков нейрогенеза (нестин, β -тубулин III, GAP43, даблкортин) в культурах дентальных стволовых клетках. Таким образом изученные пептиды могут быть рекомендованы в качестве средств, стимулирующих дифференцировку стволовых клеток в нейрогенном направлении. Практическая значимость работы Е.С. Мироновой состоит в том, 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.

Результаты исследования используются в научно-исследовательской работе АННО ВО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии» и ФГБУН Института физиологии им. И.П. Павлова РАН.

Рекомендации для дальнейшего использования результатов, полученных в работе. Пептиды AEDG и KED могут быть использованы в качестве дополнительных веществ в культуральных средах с целью замедления репликативного старения мезенхимальных мультипотентных стволовых клеток *in vitro*, длительное культивирование которых необходимо для клинического применения с целью регенерации тканей и органов.

Также пептиды AEDG и KED могут быть рекомендованы для дальнейшего экспериментального изучения с целью создания средств, стимулирующих дифференцировку стволовых клеток в нейрогенном направлении, так как установлена их способность увеличивать экспрессию генов и синтез белков нейрогенеза (нестин, β -тубулин III, GAP43, даблкортин) в культурах стволовых клеток периодонтальной связки и мезенхимальных стволовых клеток десны человека. Индуцированные мезенхимальные мультипотентные стволовые клетки могут быть использованы в регенеративной медицине для трансплантации в поврежденную область нервной системы с целью профилактики и лечения нейродегенеративных заболеваний, ассоциированных с возрастом.

Общее количество научных трудов, в том числе и не по теме диссертации – 69. По материалам диссертации опубликовано 32 научные работы, в том числе 7 статей в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки 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 и опубликованные по теме диссертации научные работы полностью отражают основные научные результаты диссертационного исследования.

Заключение. На основании вышеизложенного, диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук Е.С. Мироновой на тему: «Пептидергическая регуляция репликативного старения и нейрогенной дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток человека» может быть оценена как законченная самостоятельная научно-квалификационная работа, которая полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения учёных степеней» (утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842, с изм., утв. 21.04.2016 г. №335, от 01.10.2018 г. №1168), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Работа содержит решение актуальной для современной молекулярной геронтологии задачи: изучение влияния коротких пептидов на репликативное старение и дифференцировку денальных стволовых клеток в нейрогенном направлении, диссертация может быть принята к защите по специальностям: 14.01.30 – геронтология и гериатрия (биологические науки); 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология (биологические науки).

В качестве официальных оппонентов предлагаются:

Шамова Ольга Валерьевна, член-корреспондент РАН, доктор биологических наук, доцент, заведующая отделом общей патологии и патологической физиологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины», 197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12.

Виноградова Ирина Анатольевна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой фармакологии, организации и экономики фармации медицинского института Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Петрозаводский государственный университет», 185910, Россия, Республика Карелия, г. Петрозаводск, пр. Ленина, 33.

Предлагается направить работу Е.С. Мироновой «Пептидергическая регуляция репликативного старения и нейрогенной дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток человека» на отзыв **Ведущего учреждения** в Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7-9.

Предлагается список специалистов, которым необходимо направить автореферат в дополнение к основному списку рассылки:

№	ФИО, ученая степень, звание	Должность, место работы
1	Булгакова Светлана Викторовна, доктор медицинских наук, доцент	Зав. кафедрой гериатрии и возрастной эндокринологии, ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, 443099, Россия, Самара, ул. Чапаевская, 89.
2	Внуков Валерий Валентинович, доктор биологических наук, профессор	Зав. кафедрой биохимии, ФГАОУ ВПО «Южный федеральный университет», 344006, Россия, Ростов-на-Дону, ул. Б. Садовая, 105/42.
3	Галагудза Михаил Михайлович, член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор	Директор, Институт экспериментальной медицины ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава РФ, 197341, Россия, Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, 2.
4	Ильницкий Андрей Николаевич, доктор медицинских наук, профессор	Зав. кафедрой терапии, гериатрии и антивозрастной медицины, Академия постдипломного образования ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий» ФМБА РФ, 125371, Россия, Москва, Волоколамское шоссе, 91.
5	Крылов Борис Владимирович, доктор биологических наук, профессор	Зав. лабораторией физиологии возбудимых мембран, ФГБУН «Институт физиологии им. И.П. Павлова» РАН, 199034, Россия, г. Санкт-Петербург, наб. Макарова, д. 6.
6	Марков Александр Георгиевич, доктор биологических наук, профессор	Зав. кафедрой физиологии, ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», 199034, Россия, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9.
7	Павлова Татьяна Васильевна, доктор медицинских наук, профессор	Зав. кафедрой патологии, ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», 308015, Россия, Белгород, ул. Победы, 85.
8	Сычев Дмитрий Алексеевич член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор	Ректор, ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава РФ, 125993, Россия, Москва, ул. Баррикадная, 2/1, стр.1.

9	Шишкин Александр Николаевич, доктор медицинских наук, профессор	Зав. кафедрой факультетской терапии, ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», 199034, Россия, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9.
---	---	--

Предполагаемый срок защиты:

«19» ноября 2020 г.

Председатель комиссии:

заслуженный деятель науки РФ,
 доктор медицинских наук, профессор



Г.А. Рыжак

Члены комиссии:

заслуженный деятель науки РФ,
 доктор медицинских наук, профессор



И.М. Кветной

доктор биологических наук, профессор



Н.И. Чалисова

16 сентября 2020 г.

Подпись з.д.н. РФ, д.м.н., проф. Г.А. Рыжак,
 з.д.н. РФ, д.м.н., проф. И.М. Кветного,
 д.б.н., проф. Н.И. Чалисовой заверяю
 начальник о/к

АННО ВО НИЦ «Санкт-Петербургский
 институт биорегуляции и геронтологии»



М.В. Соколова