

Аттестационное дело № \_\_\_\_\_

Дата защиты: 13 февраля 2015 г.,

протокол № 193/372

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 002.230.01 НА БАЗЕ  
ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ  
НАУКИ ИНСТИТУТА ЦИТОЛОГИИ РАН

(Утвержден приказом МИНОБРНАУКИ РФ № 105/нк от 11.04.2012 г.)

по диссертации **Гордеевой Ольги Федоровны** на соискание ученой степени  
**доктора биологических наук**

Диссертация «Закономерности нормального и патологического развития плюрипотентных стволовых и тератокарциномных клеток млекопитающих» в виде рукописи по специальности **03.03.04. – клеточная биология, цитология, гистология** выполнена в лаборатории клеточных и молекулярных основ гистогенеза Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии развития им. Н.К. Кольцова Российской академии наук.

Диссертация принята к защите 24.10.2014 г., протокол № 187/366 диссертационным советом Д 002.230.01, созданным на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института цитологии РАН, Санкт-Петербург. Диссертационная работа выполнена в лаборатории клеточных и молекулярных основ гистогенеза Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН при поддержке 6 грантами Российского фонда фундаментальных исследований и Программами фундаментальных исследований Президиума РАН «Динамика генофондов» и «Молекулярная и клеточная биология». Работа выполнена в рамках прохождения соискательства при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН. **Научный консультант** – доктор биологических наук Васецкий Сергей Григорьевич,

главный научный сотрудник лаборатории экспериментальной эмбриологии  
Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН.

Соискатель: Гордеева Ольга Федоровна, гражданство России, с 11.2003  
г. по настоящее время - старший научный сотрудник Федерального  
государственного бюджетного учреждения науки Института биологии  
развития им. Н.К. Кольцова РАН. В 1993 году О.Ф. Гордеева окончила  
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова по  
специальности «физиология», диплом ФВ №217930. Диссертацию на  
соискание ученой степени кандидата биологических наук «Особенности  
развития мужских половых клеток у ускоренно стареющих мышей линий  
SAM: Senescence-accelerated mice» защитила в 2000 году в диссертационном  
совете при Институте биологии развития им Н.К. Кольцова РАН, Москва,  
диплом КТ №024800 от 7 июля 2000 г. После окончания университета в  
1993-1995 гг. работала в Институте молекулярной генетики РАН; с 1995 г. по  
н.в. - в Институте биологии развития им Н.К. Кольцова РАН, Москва.

**Официальные оппоненты:**

**Анисимов Владимир Николаевич**, член-корреспондент Российской  
академии наук, доктор медицинских наук, профессор, руководитель отдела  
канцерогенеза и онкогеронтологии Федерального государственного  
бюджетного учреждения «Институт онкологии им. Н.Н. Петрова»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации.

**Евгеньев Михаил Борисович**, доктор биологических наук, профессор,  
заведующий лабораторией молекулярных механизмов биологической  
адаптации Федерального государственного бюджетного учреждения науки  
Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской  
академии наук.

**Дыбан Павел Андреевич**, доктор медицинских наук, профессор, ведущий  
научный сотрудник отдела молекулярной генетики Федерального  
государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский  
институт экспериментальной медицины» Северо-Западного отделения,  
Российской академии медицинских наук

**дали положительные отзывы о диссертации.**

**Ведущая организация** Федеральное государственное бюджетное  
учреждение науки Институт цитологии и генетики Сибирского Отделения  
Российской академии наук, г. Новосибирск в своем **положительном**

3

**заключении**, подготовленном О.Л. Серовым, доктором биологических наук, профессором, заведующим лабораторией генетики развития ФГБУН Института цитологии и генетики СО РАН и утвержденном директором ИЦиГ СО РАН, академиком РАН, доктором биологических наук, профессором Н.А. Колчановым, указывает на высокую актуальность, фундаментальный характер и оригинальность полученных результатов диссертационной работы О.Ф. Гордеевой, а также практическую значимость результатов работы для стандартизации линий плюрипотентных стволовых клеток и применения разработанной автором технологии оценки эмбриотоксичности в 3D-системах культивирования *in vitro* плюрипотентных стволовых клеток млекопитающих. Диссертация Гордеевой О.Ф. полностью соответствует пп. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней» от 24.09.2013 г., а ее автор достоин присуждения степени доктора биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология. Отзыв на диссертацию О.Ф. Гордеевой заслушан и обсужден на межлабораторном семинаре по молекулярной генетике, клеточной биологии и биоинформатике (22 декабря 2014 г, протокол № 16).

Соискатель имеет 92 публикации, в том числе по теме диссертации 38 публикаций, из них 23 опубликованы в рецензируемых научных изданиях из списка, рекомендованного ВАК. Из них 10 наиболее значимых работ О.Ф. Гордеевой по теме диссертации:

1. **Gordeeva O.**, Zinovieva R., Smirnova Yu., Payushina O., Nikonova T., Khrushchov N. Differentiation of embryonic stem cells after transplantation into peritoneal cavity of irradiated mice and expression of specific germ cell genes in pluripotent cells. *Transpl. Proc.* 2005. V. 37 №1. P. 295-298. (*Обнаружена экспрессия генов, специфических для линии половых клеток, в тератомах*)
2. **Гордеева О.Ф.**, Красникова Н.Ю., Ларионова А.В., Крылова Т.А., Полянская Г.Г., Зиновьева Р.Д., Гуляев Д.В., Прыжкова М.В., Никольский Н.Н., Хрущов Н.Г. Анализ экспрессии генов, специфических для плюрипотентных и первичных половых клеток, в линиях эмбриональных стволовых клеток человека и мыши. *ДАН.* 2006. Т. 406. №6. С. 835-839. (*Выявлены различия в экспрессии генов, специфических для линии половых клеток, в линиях эмбриональных стволовых клеток мыши и человека*)
3. Кольцова А.М., **Гордеева О.Ф.**, Крылова Т.А., Лифанцева Н.В., Мусорина А.С., Яковлева Т.К., Полянская Г.Г. Сравнительные

характеристики новых линий эмбриональных стволовых клеток человека SC5, SC6, SC7 и SC3a. *Онтогенез*. 2011. Т. 42. №4. С. 249-263. *(Выявлены различия в экспрессии генов, специфических для линии половых клеток, в новых характеризующихся линиях эмбриональных стволовых клеток человека)*

4. N. Lifantseva, A. Koltsova, T. Krylova, T. Yakovleva, G. Poljanskaya, **O. Gordeeva**. Expression Patterns of Cancer-Testis Antigens in Human Embryonic Stem Cells and Their Cell Derivatives Indicate Lineage Tracks. *Stem Cell Intern.* 2011. V. 2011. ID 795239. doi:10.4061/2011/795239. *(Определены профили экспрессии раково-тестикулярных антигенов в плюрипотентных стволовых и разных типах раковых клеток человека и мыши)*

5. **Gordeeva O. F.** Normal and Pathological Development of Pluripotent Stem Cells. *J Stem Cells*. 2011. V. 6. №3. P. 129-154. *(Проведен анализ данных о генетических нарушениях и функциональной активности сигнальных путей в нормальных и мутантных плюрипотентных стволовых клетках)*

6. **Гордеева О.Ф.**, Лифанцева Н.В., Хайдуков С.В. Паттерны экспрессии генов, специфических для линии половых клеток, в плюрипотентных стволовых клетках мыши и человека связаны с регуляцией базового и первичного статусов плюрипотентности. *Онтогенез*. 2011. Т. 42. №6. С. 403-424. *(Выявлены различия в профилях экспрессии генов, специфических для линии половых клеток, в плюрипотентных стволовых клетках млекопитающих в базовом и первичном статусах плюрипотентности)*

7. **Gordeeva O.F.**, Nikonova T.M. Development of Experimental Tumors Formed by Mouse and Human Embryonic Stem and Teratocarcinoma Cells after Subcutaneous and Intraperitoneal Transplantations into Immunodeficient and Immunocompetent Mice. *Cell Transplant.* 2013. V.22. №10. P. 1901-1914. *(Установлена динамика роста и дифференцировки экспериментальных опухолей, формируемых эмбриональными стволовыми и тератокарциномными клетками мыши и человека)*

8. Лифанцева Н.В., Кольцова А.М., Полянская Г.Г., **Гордеева О.Ф.** Экспрессия факторов семейства TGF $\beta$  и фактора роста фибробластов FGF2 в эмбриональных стволовых клетках мыши и человека, поддерживаемых в разных системах культивирования. *Онтогенез*. 2013. Т. 44. №1. С. 357-365. *(Выявлены различия в сигнальной регуляции поддержания in vitro недифференцированных эмбриональных стволовых клеток мыши и человека)*

9. **Гордеева О. Ф.** Цитотоксические эффекты этопозида на разных стадиях дифференцировки эмбрионидных тел, сформированных эмбриональными стволовыми клетками мыши. *Онтогенез*. 2013. Т. 44. №6. С.381-388. *(Определены цитотоксические эффекты в разработанной 3D-модели ранних стадий развития на основе эмбрионидных тел разных стадий дифференцировки)*

10. **Гордеева О. Ф.** Низкая экспрессия активина А в нуллипотентных эмбриональных тератокарциномных клетках мыши и человека. *Онтогенез*. 2014. Т. 45. №4. С.272-279. *(Выявлены существенные различия в сигнальной регуляции плюрипотентных стволовых и тератокарциномных клеток мыши и человека)*

### На диссертацию и автореферат поступили отзывы:

1. Главного научного сотрудника ФГБУН Институт биологии моря ДВО РАН, профессора, доктора биологических наук **Дроздова Анатолия Леонидовича**. Отзыв положительный, содержит вопрос о концепциях канцерогенеза, которые рассматриваются в диссертации.
2. Заведующего лабораторией молекулярных основ эмбриогенеза ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН профессора, доктора биологических наук **Зарайского Андрея Георгиевича**. Отзыв положительный, без замечаний.
3. Профессора кафедры эмбриологии Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, доктора биологических наук **Белюсова Льва Владимировича**. Отзыв положительный, без замечаний.
4. Заведующего лабораторией клеточной патологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт цитологии Российской академии наук, профессора, доктора биологических наук **Кудрявцева Бориса Николаевича**. Отзыв положительный, содержит вопросы по формулировкам выводов и замечания по оформлению рисунков автореферата и печаткам.
5. Руководителя группы генетики клеточных популяций, ведущего научного сотрудника ФГБУН Институт цитологии РАН профессора, доктора биологических наук **Михайлова Вячеслава Михайловича**. Отзыв положительный, содержит вопрос о судьбе ранних эмбриональных клеток, экспрессирующих ген *Ddx4*.
6. Профессора клеточной биологии Университета Теннесси (США), доктора биологических наук, профессора **Игнатовой Татьяны Николаевны**. Отзыв положительный, без замечаний.
7. Профессора кафедры эмбриологии Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, доктора биологических наук **М.Л. Семеновой**. Отзыв положительный, без замечаний.

**Выбор официальных оппонентов** обосновывается тем, что они являются признанными экспертами и имеют публикации в рецензируемых международных и отечественных журналах в области клеточной и молекулярной биологии, канцерогенеза, регуляции экспрессии генов, соответствующей теме диссертационной работы О.Ф. Гордеевой. **Выбор ведущей организации** обосновывается тем, что ФГБУН ИЦиГ СО РАН - это ведущая научная организация России, среди направлений исследований которой - изучение молекулярно-генетических механизмов эмбриогенеза

различных видов животных, механизмов онкогенеза и биологии стволовых клеток, а также разработка теоретических основ клеточных технологий.

**Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:**

**разработана концепция** о факторах, регулирующих поддержание базового (ground state) и первичного (primed state) статусов плюрипотентности клеток млекопитающих (экспрессия генов *Oct4*, *Nanog*, *Dppa3*, *Dazl*, *Vasa/Ddx4*, специфических для развития линии половых клеток, и высокая активность сигнальных путей факторов семейства TGF $\beta$ ), позволившая выявить качественно новые закономерности в регуляции плюрипотентности, самоподдержания и дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток млекопитающих;

**предложена оригинальная гипотеза** об участии раково-тестикулярных антигенов семейств MAGE в нормальной дифференцировке плюрипотентных стволовых клеток млекопитающих в соматические и половые клетки, при нарушении которой в раковых клетках изменяется характер экспрессии этих антигенов;

**доказана** возможность использования данных о профилях экспрессии генов, специфических для линии половых клеток, для определения потенциала к дифференцировке новых линий эмбриональных стволовых клеток человека SC3a, SC5, SC6, SC7;

**введены новые представления** о функциональной роли сигнальных путей PI3K/Akt, MEK/ERK и факторов семейства TGF $\beta$  в регуляции баланса процессов самообновления и дифференцировки нормальных плюрипотентных стволовых клеток и опухолевых тератокарциномных клеток.

**Теоретическая значимость исследования** обоснована тем, что:

**доказано**, что поддержание базового и первичного статусов плюрипотентности клеток млекопитающих связана с экспрессией генов, специфических для развития линии половых клеток. В частности, высокие уровни экспрессии генов *Oct4/OCT4* и *Ddx4/DDX4* характерны для клеток в

базовом статусе плюрипотентности, а при переходе в первичный статус плюрипотентности постепенно снижается уровень экспрессии *Ddx4/DDX4*. Впервые **показано**, что профили экспрессии генов, специфических для линии половых клеток, коррелируют с потенциалом к дифференцировке плюрипотентных стволовых клеток млекопитающих, что расширяет представления о механизмах регуляции плюрипотентного статуса клеток млекопитающих;

применительно к проблематике диссертации результативно **использован комплекс существующих экспериментальных методик** для характеристики линий эмбриональных стволовых клеток человека и мыши, анализа в них активности сигнальных путей и экспрессии регуляторных генов, для определения их опухолевого потенциала и потенциала к дифференцировке при трансплантации плюрипотентных и тератокарциномных клеток в разные ткани животных-реципиентов, для тестирования цитотоксических эффектов химических веществ в плюрипотентных стволовых клетках;

**изложена новая гипотеза** об участии раково-тестикулярных антигенов в дифференцировке плюрипотентных стволовых клеток млекопитающих в соматические и половых клетки. На основе различий в профилях экспрессии раково-тестикулярных антигенов в нормальных плюрипотентных и опухолевых клетках могут быть обнаружены трансформированные клетки в культивируемых популяциях *in vitro*;

**раскрыты** принципы регуляции баланса пролиферативных и антипролиферативных сигналов, обеспечиваемых активностью сигнальных путей PI3K/Akt, MEK/ERK и факторов семейства TGF $\beta$ , при самообновлении и дифференцировке нормальных плюрипотентных стволовых клеток мыши и человека, а также причины их дисбаланса в опухолевых тератокарциномных клетках;

**определены** ключевые факторы, влияющие на динамики роста, дифференцировки и морфогенеза эмбрионных тел, формируемых

плюрипотентными стволовыми клетками различного происхождения, на начальных стадиях дифференцировки в 3D-системе культивирования.

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

**предложены** новые критерии оценки потенциала к дифференцировке для линий плюрипотентных стволовых клеток человека для их стандартизации при создании клеточных банков для технологий регенеративной медицины; **определены** критические параметры роста и дифференцировки плюрипотентных стволовых и тератокарциномных клеток человека и мыши *in vivo* в тканях взрослых животных, которые могут быть использованы для разработки технологии оценки рисков развития опухолей после трансплантации плюрипотентных стволовых клеток и их производных в ткани реципиентов;

**создана** 3D-модель *in vitro* дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток млекопитающих для использования в качестве тест-системы для доклинических фармакологических и токсикологических исследований новых лекарств на эмбриотоксичность;

**представлены** материалы, которые могут быть использованы в теоретических курсах дисциплин по клеточной биологии и биологии развития для студентов биологических и медико-биологических факультетов.

**Оценка достоверности результатов исследования выявила:**

**для экспериментальных работ** было использовано сертифицированное оборудование, показана воспроизводимость результатов на разных клеточных линиях;

**использованы** современные методы сбора и анализа экспериментальных данных;

**теория** и выдвинутые положения согласуются с опубликованными экспериментальными данными по теме диссертации;

**идеи базируются** на анализе и обобщении работ, выполненных автором и опубликованных российскими и зарубежными исследователями в области биологии стволовых и опухолевых клеток;



