

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 208.072.14 НА БАЗЕ
ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО АВТОНОМНОГО
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«РОССИЙСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.И. ПИРОГОВА»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ ПО
ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА
НАУК

аттестационное дело № _____
решение диссертационного совета от 21.01.2021 № 1

О присуждении Рысенковой Карине Дмитриевне, гражданке Российской Федерации ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Молекулярные механизмы участия урокиназного рецептора в дифференцировке и выживаемости клеток нейробластомы мыши» по специальности 03.01.04 - «Биохимия» принята к защите 08.10.2020г., протокол № 1, диссертационным советом Д 208.072.14 на базе Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, (приказ № 1135/нк от 23.09.2015г.), почтовый адрес: 117997, Москва, ул. Островитянова, д.1.

Соискатель Рысенкова Карина Дмитриевна 1993 года рождения, в 2015 г. с отличием окончила биологический факультет Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова» (квалификация биохимик по специальности «биохимия»). В период с 2015 по 2018 гг. обучалась в очной аспирантуре по специальности 03.01.04 - «Биохимия» на кафедре биохимии и молекулярной медицины факультета фундаментальной медицины Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова» (по окончании присвоена квалификация исследователь, преподаватель-

исследователь по направлению 30.06.01 «Фундаментальная медицина»). В настоящее время работает младшим научным сотрудником в лаборатории молекулярной эндокринологии института экспериментальной кардиологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный Медицинский Исследовательский Центр Кардиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Диссертация выполнена на кафедре биохимии и молекулярной медицины факультета фундаментальной медицины Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Научные руководители:

Рубина Ксения Андреевна - доктор биологических наук, доцент, заведующий лабораторией морфогенеза и репарации тканей факультета фундаментальной медицины Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»;

Семина Екатерина Владимировна - кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной эндокринологии института экспериментальной кардиологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный Медицинский Исследовательский Центр Кардиологии Министерства здравоохранения Российской Федерации».

Официальные оппоненты:

Гривенников Игорь Анатольевич - доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией молекулярной генетики соматических клеток Федерального государственного бюджетного учреждения Институт молекулярной генетики Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»;

Яшин Денис Владимирович - доктор биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммуногенетики рака

Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биологии гена Российской академии наук».

Оппонентами даны положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация:

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский университет) в своем положительном заключении, подписанным Глуховым Александром Ивановичем – доктором биологических наук, профессором, заведующим кафедрой биологической химии лечебного факультета Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) и утвержденном Бутнару Денисом Викторовичем - кандидатом медицинских наук, доцентом, проректором по научно-исследовательской работе Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) (протокол №2 от 10.11.2020г.) отметила, что соискатель использовала разнонаправленные экспериментальные подходы и тем самым комплексно подошла к решению главной задачи работы, а именно, выяснению молекулярного механизма, опосредующего участие рецептора урокиназы (uPAR) в процессах дифференцировки и выживаемости линейных клеток нейробластомы мыши Neuro2a с участием рецепторных тирозиновых киназ EGFR и Trk; сигнальный путь, активируемый uPAR при участии тирозиновых киназ Trk и EGFR, усиливает рост нейритов и, таким образом, может быть использован при разработке терапевтических подходов для восстановления иннервации при травмах различного генеза и нейродегенеративных заболеваниях, а также рассматриваться в качестве мишени для

терапевтических препаратов комплексного воздействия на uPAR и рецепторные тирозиновые киназы Trk и EGFR, опосредующие выживаемость, дифференцировку и пролиферацию нейробластомы; результаты диссертационной работы могут быть использованы в исследованиях лабораторий биомедицинского профиля, которые занимаются изучением механизмов дифференцировки клеток, а также процессов морфогенеза и репарации тканей; разработанный в диссертации подход может быть использован для проведения нокаута генов интереса в клеточных культурах с нестабильным кариотипом. Отзыв положительный, критических замечаний не содержит. В заключении указывается, что по своей актуальности, научной новизне, теоретической и научно-практической значимости, достоверности полученных результатов и обоснованности выводов диссертационная работа Рысенковой К.Д. полностью отвечает требованиям на соискание ученой степени кандидата наук согласно п.9 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24.09.2013г. (с изменениями в редакции постановлений правительства Российской Федерации №335 от 21.04.2016г., №748 от 02.08.2016г., №650 от 29.05.2017г., №1024 от 28.08.2017г., №1168 от 01.10.2018г.), а сам автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 - Биохимия.

Соискатель имеет 18 опубликованных работ по теме диссертации, в том числе 10 научных статей, 3 из которых опубликованы в рецензируемых профильных научных журналах, включенных в перечень ВАК, 7 статей – в зарубежных высокорейтинговых журналах, и 8 тезисов докладов на конгрессах и конференциях. Общий объем публикаций составил 8,7 печатных листов и содержит 82 % авторского вклада.

Наиболее значимые научные работы по теме диссертации:

1. Rysenkova K.D. Urokinase receptor deficiency results in EGFR-mediated failure to transmit signals for cell survival and neurite formation in mouse neuroblastoma cells / Rysenkova K.D., Klimovich P.S., Shmakova A.A., Karagyaour

M.N., Ivanova K.A., Aleksandrushkina N.A., Tkachuk V.A., Rubina K.A., Semina E.V. //Cellular Signalling. – 2020. – V. 75. 109741. IF (Scopus) – 3,968 doi.org/10.1016/j.cellsig.2020.109741.

2. Rysenkova K.D. CRISPR/Cas9 nickase mediated targeting of urokinase receptor gene inhibits neuroblastoma cell proliferation / Rysenkova K.D., Semina E.V., Karagyaour M.N., Shmakova A.A., Dyikanov D.T., Vasiluev P.A., Rubtsov Y.P., Rubina K.A., Tkachuk V.A. // Oncotarget. – 2018. – V. 9, № 50. – P. 29414-29430. IF (WoS, Scopus) - 3,71.

3. Рысенкова К.Д. Использование технологии редактирования генома CRISPR/Cas9 для подавления экспрессии гена урокиназного рецептора в клетках нейробластомы / Рысенкова К.Д., Семина Е.В., Карагяур М.Н., Шмакова А.А., Дыйканов Д.Т., Рубина К.А., Ткачук В.А. // Технологии живых систем. – 2018. – V. 15, №1. – P. 10-19. IF (РИНЦ) – 0,187.

На автореферат поступили отзывы от:

Хапчаева Аскера Юсуфовича, кандидата биологических наук, старшего научного сотрудника лаборатории клеточной подвижности Института экспериментальной кардиологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный Медицинский Исследовательский Центр Кардиологии Министерства здравоохранения Российской Федерации».

Отзыв на автореферат содержит оценку актуальности работы, научной новизны и практической значимости исследования. Отмечается, что в работе использованы современные молекулярно-генетические и биохимические методы исследования, работа полностью соответствует требованиям, предъявляемым к диссертационным работам на соискание ученой степени кандидата наук. Отзыв критических замечаний не содержит, в нем предложена интерпретация полученных соискателем результатов по индукции роста нейритов на длительных сроках ингибирования активности рецептора EGFR;

Рубцова Юрия Петровича, кандидата химических наук, старшего научного сотрудника лаборатории молекулярной онкологии Института биоорганической химии им. ак. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

В отзыве отмечено, что актуальность исследования вопросов не вызывает; автор использовал изящную стратегию удаления рецептора урокиназы в клетках с помощью направленного редактирования генома CRISPR-Cas9, в результате были получены новые ценные данные об участии рецептора урокиназы в росте и ветвлении нейритов, что приводит к дедифференцировке и гибели клеток; достоверность результатов сомнений не вызывает, работа выполнена на высоком экспериментальном уровне, прекрасно оформлена, выводы полностью соответствуют представленным результатам; работы автора по теме диссертации опубликованы во множестве зарубежных журналов, что значительно превосходит требования ВАК к числу и уровню публикаций; диссертационная работа является законченной научно-квалификационной работой и соответствует требованиям, предъявляемым к работам на соискание ученой степени кандидата биологических наук.

Выбор официальных оппонентов обосновывается наличием у них публикаций в рецензируемых отечественных и международных журналах по тематике, представленной к защите диссертации, выбор ведущей организации – широко известными прикладными и научными достижениями в области биохимической регуляции, в том числе нейральных стволовых клеток.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

- получена линия клеток Neuro2a, стабильно гиперэкспрессирующая uPAR. С использованием технологии CRISPR/Cas9n получены клоны клеток Neuro2a с подавленной экспрессией uPAR или нокаутные по гену *uPAR*;

- установлено, что активность uPAR опосредует направленный рост нейритов и выживаемость Neuro2a. Блокирование активности uPAR вызывает формирование нейритов и усиливает их ветвление, сопровождаемое повышением экспрессии RIT1 и MAP2 – белков, ответственных за ветвление аксонов. Длительное блокирование uPAR активирует киназы Akt (S473) и p38, снижает экспрессию маркера дифференцировки и выживаемости нейронов NeuN и приводит к гибели клеток по механизму деградации ДНК с участием белка PARP-1;

- выявлено, что экспрессия uPAR поддерживает дифференцировку и выживаемость Neuro2a. При нокауте *uPAR* снижается пролиферация Neuro2a и рост нейритов, что сопровождается снижением pERK1/2, ki67 (маркера пролиферации) и активацией апоптоза (каспаза-3 и белок PARP-1);

- показано, что uPAR определяет активацию сигнализации с участием EGFR и ERK1/2 и механизмы клеточного ответа Neuro2a. Экспрессия и активность uPAR вызывает фосфорилирование EGFR и ERK1/2 и стимулирует рост нейритов. При блокировании активности uPAR или нокауте *uPAR* уменьшается содержание активных форм EGFR и ERK1/2 и падает выживаемость клеток;

- установлено, что нокаут *uPAR* снижает содержание мРНК полноразмерного TrkC и его посредника pAkt (T308).

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

результаты проведенных исследований имеют фундаментальное значение для расширения представлений о влиянии сигнального пути uPAR, опосредуемого рецепторными тирозиновыми киназами Trk и EGFR на выживаемость, дифференцировку и пролиферацию клеток нейробластомы.

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

результаты данной работы могут быть применены при разработке терапевтических подходов для восстановления иннервации при травмах различного генеза и нейродегенеративных заболеваниях, а также терапевтических препаратов комплексного воздействия на uPAR и рецепторные тирозиновые киназы Trk и EGFR, опосредующие выживаемость, дифференцировку и пролиферацию нейробластомы.

Результаты диссертационной работы внедрены в научно-исследовательскую и образовательную деятельность факультета фундаментальной медицины Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова» и в научно-исследовательскую деятельность лаборатории молекулярной эндокринологии

Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный Медицинский Исследовательский Центр Кардиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Оценка достоверности результатов исследования выявила:

количественную и качественную сопоставимость результатов, полученных автором в ходе исследования, с результатами последних публикаций других авторов, выполненных по схожей тематике; результаты, приведенные соискателем, получены с использованием современных и широко применяемых биохимических методов исследования и подходов клеточной биологии, характеризуются высокой степенью воспроизводимости; выводы аргументированы, научно обоснованы и являются прямым следствием результатов проведенных автором исследований. Оригинальность работы согласно системе «Антиплагиат» составляет 95,55%.

Личный вклад соискателя состоит в его непосредственном участии на всех этапах проведения исследования, получении и обработке экспериментальных данных, статистической обработке полученных данных и теоретическом обобщении полученных результатов. Основные результаты диссертационной работы представлены лично автором в форме устных докладов на 3-х российских конференциях с международным участием.

Диссертационным советом сделан вывод о том, что диссертация представляет собой научно-квалификационную работу, которая полностью соответствует требованиям п.9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24.09.2013г. (с изменениями в редакции постановлений Правительства Российской Федерации №335 от 21.04.2016г., №748 от 02.08.2016г., №650 от 29.05.2017г., №1024 от 28.08.2017г., №1168 от 01.10.2018г.), в диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени работах, в которых изложены основные результаты диссертации.

На заседании 21 января 2021года диссертационный совет принял решение присудить Рысенковой Карине Дмитриевне ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 23 человек, из них 4 доктора наук по специальности 03.01.04 – Биохимия (биологические науки), участвовавших в заседании, из 32 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за присуждение ученой степени – 23 , против присуждения ученой степени - нет, недействительных бюллетеней - нет.

Председатель диссертационного
совета, доктор биологических наук,
профессор



Кузнецов Дмитрий Анатольевич

Учёный секретарь диссертационного
совета, доктор медицинских наук,
профессор



Кягова Алла Анатольевна

22.01.2021г.

