

Отзыв официального оппонента доктора биологических наук Яшина Дениса Владимировича на диссертационную работу Рысенковой Марины Дмитриевны “МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ УЧАСТИЯ УРОКИНАЗНОГО РЕЦЕПТОРА В ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ И ВЫЖИВАЕМОСТИ КЛЕТОК НЕЙРОБЛАСТОМЫ МЫШИ”, представленную к защите в диссертационный совет 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 на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – “Биохимия”.

Диссертация Марины Дмитриевны посвящена интересной и важной задаче – исследованию механизмов функционирования урокиназного рецептора на модели мышечной нейробластомы. Актуальность проблемы обусловлена важностью понимания механизмов иннервации во взрослом организме и при морфогенезе органов и тканей. Рассматриваемый в работе рецептор не только участвует в протеолизе белков внеклеточного матрикса, но и обладает рядом сигнальных эффектов, описанных в клетках, приводящих к их миграции, пролиферации и дифференцировке. Также описан ряд эффектов урокиназной системы в регенерации нервной ткани, однако к настоящему времени неизвестны молекулярные механизмы участия урокиназы и ее рецептора в пролиферации и выживаемости нейронов, а также их дифференцировке и нейритогенезе. Данная диссертационная работа существенно расширяет существующее представление о роли системы урокиназного рецептора в этих процессах.

Диссертационная работа имеет классическую структуру и состоит из разделов “Введение”, “Обзор литературы”, “Материалы и методы”, “Результаты и их обсуждение”, “Заключение”, “Выводы”, “Список сокращений”, “Список литературы”. Диссертационная работа изложена на 183 страницах, иллюстрирована 3 таблицами и 37 рисунками. Список литературы включает 354 источника.

Раздел Введение кратко аргументирует актуальность проблемы, кратко описывает систему урокиназного рецептора, uPAR, основного объекта исследования данной работы. Кроме того, данный раздел описывает основные цели и задачи работы, ее научную новизну и практической значимости, упоминает основные методы исследования и суммирует выносимые на защиту положения работы. Наконец, в нем приведены сведения о структуре и объеме работы, достоверности результатов, личном вкладе автора и апробации работы.

Обзор литературы посвящен характеристике системы урокиназного рецептора, его лиганда и ингибиторов. Он хорошо структурирован и содержит все необходимые данные для понимания диссертационной работы. В нем описаны основные функции урокиназы и механизмы работы двух ингибиторов. Существенную часть обзора занимают данные, свидетельствующие о большом количестве взаимодействий урокиназного рецептора с другими рецепторами и сигнальными системами, что предполагает его участие в различных процессах, таких как пролиферация, клеточная адгезия, миграция, эндоцитоз и эпителиально-мезенхимальный переход. Обзор написан подробно, ссылается на большое количество источников, и в целом дает понять, что диссертант хорошо разбирается в тематике исследований. В обзоре встречается некоторое количество неудачных выражений и англицизмов, но это не умаляет его достоинств.

Глава Материалы и методы содержит краткие методики всех экспериментов, проведенных в работе. Этот раздел позволяет понять схему проведения всех экспериментов и воспроизвести их. Раздел написан хорошо и грамотно, к нему у меня не имеется замечаний.

Раздел Результаты и обсуждение состоит из трех больших глав, описывающих результаты работы. В первой главе автор показывает создание клеточной системы с модифицированной экспрессией урокиназного рецептора uPAR, необходимой для дальнейшей работы. В ходе этой экспериментальной работы диссертанту удалось получить несколько клеточных линий, имеющих как повышенную, так и пониженную экспрессию исследуемого рецептора, что закладывает прочный фундамент под последующие экспериментальные данные. Во второй главе описываются результаты, полученные автором при исследовании влияния uPAR на рост аксонов. Автором было продемонстрировано, что активность uPAR опосредует направленный рост нейритов и охарактеризованы внутриклеточные механизмы, вовлеченные в этот процесс. Третий и самый большой раздел посвящен оценке влияния активности uPAR на выживаемость и дифференцировку клеток Neuro2a. В нем автору удалось показать, что экспрессия uPAR поддерживает дифференцировку и выживаемость Neuro2a. При нокауте uPAR снижается пролиферация Neuro2a и рост нейритов, что сопровождается снижением pERK1/2, маркера пролиферации ki67 и активацией апоптоза. 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 подавлении активности uPAR или нокауте uPAR уменьшается содержание активных форм EGFR и ERK1/2 и падает выживаемость клеток. Нокаут uPAR снижает содержание мРНК полноразмерного TrkC и его посредника pAkt. К этому разделу имеется ряд

замечаний, которые носят скорее дискуссионный характер. При описании клеточной смерти автор демонстрирует повышенный уровень активного фермента каспазы-3 в клетках с пониженной экспрессией uPAR. Интересны механизмы активации этой эффекторной каспазы. Возможно использование специфических ингибиторов каспазы 3 или других каспаз могло бы пролить свет на этот аспект работы. Другим обращаящим на себя внимание результатом работы является возрастание клеточного индекса при культивировании клеток как с повышенной, так и с пониженной экспрессией uPAR. Автор объясняет это двумя различными механизмами увеличения клеточного индекса в каждом из опытов. Возможно, этот аспект работы нуждается в дополнительных исследованиях. Сделанные замечания не снижают ценность данной работы и значимость полученных результатов.

Выводы, сделанные автором в данной работе, абсолютно достоверны, подкреплены экспериментальным материалом и соответствуют поставленным задачам.

Данная диссертация обладает высокой научной новизной и является значимой для понимания механизмов роста нервной ткани. Полученные в работе данные могут быть использованы при разработке подходов для стимуляции роста аксонов при восстановлении иннервации после травмы нервов.

Текст автореферата полно отражает содержание диссертации. Основные результаты диссертации отражены в 18 печатных работах, в том числе 10 статей в научных рецензируемых изданиях, и 8 публикаций в сборниках материалов научных конференций.

Таким образом, диссертационная работа К.Д. Рысенковой “Молекулярные механизмы участия урокиназного рецептора в дифференцировке и выживаемости клеток нейробластомы мыши” является законченной научно-квалификационной работой, выполненной под руководством доктора биологических наук, доцента Рубиной Ксении Андреевны и кандидата биологических наук Семиной Екатерины Владимировны, содержащей новое решение актуальной научной задачи – выявление механизма участия урокиназного рецептора в дифференцировке и выживаемости клеток нейробластомы. Диссертация Рысенковой Марины Дмитриевны 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.), а ее автор, Рысенкова Карина

Дмитриевна, заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – “Биохимия”.

Официальный оппонент

Яшин Денис Владимирович

Старший научный сотрудник

лаборатории Молекулярной иммуногенетики рака

Федерального государственного бюджетного учреждения науки

Института биологии гена Российской академии наук (ИБГ РАН)

Доктор биологических наук

Шифр специальности 03.01.03 – “молекулярная биология”

Адрес: г. Москва, ул Вавилова 34/5

Тел. 8-916-957-0938

Адрес электронной почты: yashin_co@mail.ru

11. 11. 2020г.



Подпись Д.В. Яшина

Директору
Директора ИБГ РАН

МАНСУРОВА Г.В.