

федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации
(Сеченовский Университет)

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по научно-исследовательской работе
ФГАОУ ВО Первый МГМУ
им. И.М. Сеченова Минздрава
России (Сеченовский Университет)
кандидат медицинских наук, доцент

Бутнару Д.В.



2020 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

о научно-практической значимости диссертационной работы Рысенковой Марины Дмитриевны «Молекулярные механизмы участия урокиназного рецептора в дифференцировке и выживаемости клеток нейробластомы мыши», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04– Биохимия.

Актуальность темы исследования

Диссертационная работа Рысенковой Марины Дмитриевны посвящена выяснению механизмов участия урокиназного рецептора в дифференцировке и выживаемости клеток нейробластомы мыши. Знание молекулярных механизмов дифференцировки и выживаемости нервных клеток служит ключом к пониманию процесса иннервации во взрослом организме, и в

настоящее время также является одним из важных направлений исследований в области регенеративной медицины. Не смотря на то, что описан ряд эффектов урокиназной системы в регенерации нервов, однако, неизвестны молекулярные механизмы участия урокиназы и ее рецептора в пролиферации и выживаемости нейронов, а также в их дифференцировке и нейритогенезе, а именно регулирует ли урокиназная система направленный рост аксонов и их ветвление.

Автором были сформулированы следующие задачи данной диссертационной работы:

1. Создать клетки нейробластомы мыши Neuro2a с различным уровнем экспрессии uPAR с использованием технологии редактирования генома CRISPR/Cas9n и методов плазмидной трансфекции (кДНК uPAR, РНК-интерференция);
2. Определить влияние экспрессии и активности uPAR на выживаемость и дифференцировку клеток нейробластомы мыши Neuro2a;
3. Оценить влияние экспрессии и активности uPAR на активацию рецепторных тирозиновых киназ EGFR и TrkC и регуляцию внутриклеточной сигнализации с участием этих рецепторов.

Из сказанного следует, что автор использовала разнонаправленные экспериментальные подходы и тем самым комплексно подошла к решению главной проблемы настоящей 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. Результаты диссертации Рысенковой К.Д. по участию урокиназного рецептора вместе с тирозинкиназными рецепторами (EGFR и Trk) в росте нейритов нервной клетки и защите нервных клеток от апоптоза, могут послужить для решения актуальной практической задачи – разработки терапевтического подхода для восстановления нерва после травмы.

Объем и содержание работы

Диссертационная работа изложена на 183 страницах, состоит из введения, трех глав (обзор литературы, материалы и методы, результаты и их обсуждение), заключения, списка сокращений и списка литературы. Список литературы включает 354 публикаций отечественных и иностранных авторов. Диссертационная работа иллюстрирована 3 таблицами и 37 рисунками.

Связь с планами соответствующих отраслей науки

Диссертационная работа Рысенковой Марины Дмитриевны выполнялась в соответствии с основными направлениями программы научных исследований кафедры биохимии и молекулярной медицины факультета фундаментальной медицины федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова».

Научная новизна исследования, полученных результатов и выводов

На модели эксплантной культуры спинального ганглия мыши (Dorsal Root Ganglia, DRG) в матрикеле впервые было показано, что блокирование uPAR усиливает ветвление отрастающих аксонов и нарушает траекторию их роста, что свидетельствует о навигационной роли uPAR в росте и регенерации нервов. На модели нейробластомы мыши Neuro2a было обнаружено, что блокирование uPAR увеличивало формирование новых нейритов и усиливало ветвление уже сформированных отрастающих нейритов, сопровождаемое активацией внутриклеточной сигнализации с участием малого G-белка RIT (ответственного за ветвление аксонов) и высокомолекулярной изоформы MAP2 белка (стабилизирует микротрубочки при ветвлении аксонов). Нарушения в росте и ветвлении нейритов в клетках Neuro2a нарушало дифференцировку этих клеток, сопровождаемую потерей экспрессии нейронального ядерного маркера NeuN, активацией киназ Akt (по

участку S473) и p38, свидетельствующих о гибели клеток. При изучении механизма было показано, что блокирование uPAR приводит к гибели Neuro2a за счет каспаза-зависимого апоптоза и деградации ДНК.

При изучении механизмов uPAR-зависимой регуляции выживаемости и дифференцировки (на модели нейритогенеза) клеток Neuro2a было установлено, что рецептор урокиназы оказывает воздействие на активность и экспрессию рецепторных тирозиновых киназ EGFR и TrkC и их нисходящих сигнальных киназ: серин-треониновой протеинкиназы Akt и митоген-активируемых протеинкиназ ERK1/2 и p38.

Достоверность результатов и обоснованность выводов

Научные положения, сформулированные автором в диссертации, основаны на изучении достаточного объема экспериментального материала, проведении статистического анализа полученных данных и публикации основных положений диссертации в научных журналах. В работе используется биохимические методы анализа (иммуоблоттинг), молекулярно-биологические методы (проведение нокаута гена *uPAR* в культуре клеток Neuro2a с использованием системы редактирования генома CRISPR/Cas9n, а также проведение полимеразной цепной реакции в реальном времени), а также подходы клеточной биологии (в том числе культура клеток): методы проточной цитофлуориметрии на клеточном сортере и автоматизированный анализ пролиферации и нейритогенеза клеток Neuro2a на приборе IncuCyte®. Результаты характеризуются высокой степенью воспроизводимости, выводы аргументированы, обоснованы и являются следствием результатов выполненных исследований.

Значимость для науки и практики полученных автором результатов

Сигнальный путь, активируемый uPAR при участии тирозиновых киназ Trk и EGFR, усиливает рост нейритов. Таким образом, этот сигнальный путь

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.

Диссертация прошла широкое обсуждение. Материалы диссертации были представлены на Международном конгрессе CRISPR-2018 (Россия, Новосибирск, 2018); III и VI Национальном Конгрессе по Регенеративной Медицине (Россия, Москва, 2017; 2019); VI Съезде физиологов с международным участием (Россия, Сочи, 2019).

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

В диссертационной работе были получены новые данные, указывающие на значение урокиназного рецептора на проведение внутриклеточной сигнализации с участием тирозиновые киназы Trk и EGFR, регулирующей рост нейритов и выживаемость клеток нейробластомы мыши. При нокауте гена *uPAR* снижалась экспрессия полноразмерной изоформы TrkC, способной к проведению внутриклеточной сигнализации и снижалась активность его сигнального посредника Akt (по участку T308, важному для выживаемости нейронов). При гиперэкспрессии uPAR увеличивался уровень фосфорилирования EGFR и его сигнального посредника ERK1/2. Блокирование uPAR в Neuro2a приводило к быстрому снижению уровня pEGFR и pERK1/2. Нокаут uPAR приводил к снижению выживаемости Neuro2a, о чем свидетельствовало трехкратное снижение уровня маркера пролиферации ki67, а также одновременная активация каспаза-зависимого апоптоза и деградация ДНК.

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. Результаты диссертационной работы были внедрены в научно-исследовательскую и образовательную деятельность на факультете фундаментальной медицины ФГБОУ МГУ имени М.В. Ломоносова и в научно-исследовательскую деятельность лаборатории молекулярной эндокринологии ФГБУ «НМИЦ Кардиологии» Минздрава России.

Личный вклад автора

Рысенкова Карина Дмитриевна принимала непосредственное участие в проведении экспериментов на всех этапах исследования. Автор самостоятельно проанализировала литературу по тематике проблемы, получила, обработала и обобщила полученные данные.

Печатные работы, опубликованные по материалам диссертации

По материалам диссертации опубликовано 18 печатных работ, в том числе 10 статей в научных рецензируемых изданиях, из них: 3 статьи в журналах, входящих в перечень ВАК, 7 статей в журналах, индексируемых в Scopus, Web of Science и 8 публикаций в сборниках материалов научных конференций.

Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации и автореферата

Принципиальных замечаний к содержанию и оформлению работы нет. В диссертационной работе Рысенковой Марины Дмитриевны четко определена цель научного исследования. Поставленные задачи успешно выполнены. Выводы логичны и отражают полученные результаты. Диссертация написана грамотным литературным языком с использованием общепринятой

терминологии, изложение содержания логичное и последовательное. В автореферате полностью отражены основные положения диссертации.

Заключение

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, и содержит новое решение актуальной задачи биохимии, связанной с выявлением механизма участия урокиназного рецептора в дифференцировке и выживаемости клеток нейробластомы. Таким образом, по своей актуальности, научной новизне, теоретической и научно-практической значимости, достоверности полученных результатов и обоснованности выводов диссертационная работа Рысенковой Карины Дмитриевны 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 ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – Биохимия.

Отзыв о научно-практической значимости диссертационной работы Рысенковой Карины Дмитриевны на тему «Молекулярные механизмы участия урокиназного рецептора в дифференцировке и выживаемости клеток нейробластомы мыши», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – Биохимия,

обсужден и утвержден на заседании кафедры 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) 10.11.2020 г., протокол № 2.

Заведующий кафедрой биологической химии
лечебного факультета ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова
Минздрава России (Сеченовский Университет),
доктор биологических наук, профессор
специальность 03.01.04 – «биохимия»



Александр Иванович Глухов

Адрес: 119991, Российская Федерация, г. Москва, ул. Трубецкая, д.8, стр.2
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования Первый Московский государственный медицинский
университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения
Российской Федерации (Сеченовский Университет)

Контактный телефон: +7-(985)-295-70-05 (моб.)

Электронная почта: aiglukhov1958@gmail.com

« 10 » 11 2020 г.