

ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени
кандидата биологических наук Турищевой Екатерины Павловны
на тему: «Влияние растительных гормонов на дифференцировку
культивируемых дермальных фибробластов человека»
по специальности 1.5.22. Клеточная биология»

Дифференцировка клеток – это сложный и очень тонко управляемый процесс, любые нарушения приводят к развитию различных патологий, и не только в процессе эмбрионального развития, но и во взрослых организмах вызывают появление таких патологий, как остеопороз, диабет II типа, фиброз или нарушение регенеративного потенциала клеток. Зачастую изменение дифференцировочного статуса клеток сопряжено с изменением секреторно-синтетических процессов в тканях. Регуляция секреторно-синтетической активности различных клеток чрезвычайно важна для поддержания нормальной жизнедеятельности тканей и целых организмов, а при их нарушениях крайне интересно найти возможные регуляторы этих процессов, позволяющие нормализовать синтез и секрецию интересующих нас белков. Кандидатами в такие регуляторы могут служить фитогормоны, или сигнальные молекулы, выделяемые клетками растений и регулирующие их рост, дифференцировку и устойчивость к стрессовым факторам. Показано, что такие вещества как абсцизовая кислота (АБК) и гиббереллиновая кислота (ГК), относящиеся к классу фитогормонов, влияют на секреторно-синтетическую активность многих животных клеток, таких как мезенхимальные стромальные клетки, бета-клетки островков Лангерганса, энтероэндокринные клетки и др. Исследование механизмов такого влияния представляет как теоретический, так и практический интерес, поскольку например их влияние на дифференцировку миофибробластов позволяет разрабатывать подходы к регуляции процессов заживления ран или

формированию фиброзов. Исследование влияния растительных гормонов АБК и ГК на дифференцировку дермальных фибробластов и связанную с этим изменение их секреторно-синтетической активности и является основной задачей представленной диссертации. Сразу хочу оговорить, что, на мой взгляд, основным недостатком представленной работы является некоторая путаница в терминах. Автор рассматривает в качестве индуктора дифференцировки фибробластов изменение активации сигнального каскада, носящего название «ответ на неправильно свернутые белки - unfolded protein response – UPR. UPR активируется в ответ на стресс эндоплазматического ретикулума (ЭПР), это адаптивный ответ клетки, нацеленный на нормализацию гомеостаза клетки и её выживание. В то же время во многих местах текста автор просто ставит термины «стресс ЭПР» и «UPR» друг за другом в скобках, что подразумевает, что это одно и то же явление. И если, читая текст диссертации и интересный и хорошо написанный литературный обзор можно разобраться в этой терминологии, то в автореферате, где из-за недостатка места подробные объяснения опущены, понятия «стресс ЭПР» и UPR часто путаются, что создает определенные сложности при восприятии материала. Выяснение механизмов, включенных в регулировку секреторной активности клеток и определение места UPR в этих процессах – важная теоретическая задача клеточной биологии, потому что вопрос о том, является ли активация UPR индуктором дифференцировки клеток или же UPR запускается из-за повышенного синтеза секреторных белков в ходе дифференцировки остается открытым. Разработка новых подходов, способных нормализовать секреторную активность клеток и оказывать влияние на уровень их дифференцировки за счёт воздействия на молекулярные компоненты UPR, может оказаться перспективным направлением для решения проблем, связанных с терапией многих патологий.

Диссертация построена по стандартному образцу и состоит из следующих разделов: Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты, Обсуждение, Заключение, Выводы, Публикации по теме работы и Список литературы. Работа напечатана на 148 страницах, снабжена 23 рисунками и 1 таблицей. Список литературы содержит 230 ссылок. Во Введении автор обосновывает выбранную тему диссертации, обсуждает теоретическую и практическую значимость работы, подчеркивая ее актуальность и новизну. Обзор литературы хороший и интересный. Автор анализирует современные работы, посвященные дифференцировке фибробластов в миофибробласты и разбирает возможные нарушения этого процесса и возникающие в результате этих нарушений патологии. Кроме того, автор подробно разбирает явление UPR и различные сигнальные пути, вовлеченные в UPR, а также рассматривает известные данные о роли UPR в регуляции дифференцировки фибробластов. Также подробно рассматриваются фитогормоны и их роль в жизни растений и их действие на животные клетки. Мне показалось очень интересным тот факт, что АБК синтезируется не только растительными, но и животными клетками и вовлечена во многие регуляторные пути в животных клетках. Так что, строго говоря, она не является фитогормоном, а скорее цитокином со сложным регуляторным действием, который обладает как провоспалительным, так и противовоспалительным действием и вовлечена во многие метаболические процессы в животных клетках. Хотелось бы услышать комментарии автора по этому поводу. Современные данные о действии ГК также очень противоречивы, и автор очень подробно анализирует данные разных лабораторий, что позволяет в дальнейшем сопоставить эти данные с результатами, полученными при выполнении данной диссертации.

В главе Материалы и Методы автор очень подробно описывает использованные подходы и методы. Автор использовал широкий

ассортимент современных методов клеточной и молекулярной биологии, в частности самые разные виды микроскопии – световую флуоресцентную микроскопию, сканирующую и просвечивающую электронную микроскопию. В качестве основного объекта исследования автор использовал культуру дермальных фибробластов (первичную культуру? – этого четко не сказано). Анализ изменения экспрессии генов, характерных для UPR проводили с помощью ПЦР в реальном времени, кроме того оценивали изменение метаболической активности клеток в результате дифференцировки, проводили иммуноферментный анализ уровня секреции проколлагена 1 и фибронектина, определяли уровень синтеза этих белков с помощью Вестерн-блота, использовали проточную цитофлуорометрию для анализа влияния фитогормонов на клеточный цикл. Все методы адекватно подобраны и соответствуют поставленным задачам.

В разделе «Результаты» описаны собственно результаты, полученные автором исследования. Предложенный подход одновременно оценивать и индуцицию UPR и изменение секреторно активности и дифференцировочного статуса клеток под действием фитогормонов является очень интересным подходом, дающим возможность судить о клеточных механизмах, обеспечивающих эти процессы. Авторы показали, что и АБК и ГК стимулируют UPR в дермальных фибробластах, но при этом под действием этих агентов активируются разные маркерные гены, характерные для разных сигнальных путей UPR (в обзоре литературы представлены данные, свидетельствующие о том, что UPR может осуществляться тремя независимыми сигнальными путями). Для выяснения механизмов стимулирования UPR сравнивали действие АБК и ГК с действием канонического активатора стресса ЭПР и показали, что все три агента вызывают разные морфологические изменения в структуре ЭПР. Разными методами было показано, что фитогормоны влияют на секреторную

активность дермальных фибробластов, но это влияние разнонаправлено и свидетельствует о том, что АБК стимулирует дифференцировку дермальных фибробластов в миофибробласты, повышая их секреторно-синтетическую активность и увеличивая долю миофибробластов в популяции, а ГК напротив подавляет секреторно-синтетическую активность и дифференцировку этих клеток. Так же было исследовано влияние фитогормонов на морфологию клеток, цитоскелет и структуру ЭПР и показано отсутствие цитотоксического эффекта, эффекта на клеточный цикл и на морфологию ЭПР, что говорит о достаточно мягком действии этих веществ, которые с одной стороны вызывают UPR и меняют дифференцировочный статус клеток, а с другой не наносят существенного вреда. Полученные результаты проанализированы статистически и показана их статистическая достоверность.

Обсуждение результатов очень интересно. Автор разбирает оставшиеся невыясненными вопросы и фактически намечает планы дальнейших работ в этой области, которые кажутся очень перспективными. Заключение, сделанное авторами, очень помогает систематизировать все полученные результаты. Положения, выносимые на защиту, соответствуют полученным результатам и полностью обоснованы. Выводы обоснованы и соответствуют поставленным целям и полученным результатам. Автореферат соответствует содержанию диссертации и отражает содержание публикаций автора. Очень жалко, что вероятно из-за недостатка места в автореферате не приведены названия опубликованных тезисов. Небольшим замечанием является то, что Рис. 5 в автореферате не соответствует его описанию в тексте.

Таким образом, выполнены актуальные исследования, демонстрирующие действие фитогормонов АБК и ГК на дифференцировку и секреторно-синтетическую активность дермальных фибробластов. Полученные результаты могут быть использованы как основа для дальнейших исследований механизмов клеточной дифференцировки. Работа

также имеет большое практическое значение, так как показано действие АБК, стимулирующее продукцию миофибробластов, что может быть использовано при разработке агентов, помогающих заживлению ран. С другой стороны, было показано, что ГК, наоборот, ингибирует дифференцировку в миофибробласты и таким образом ГК или ее производные могут рассматриваться в перспективе при разработке агентов, препятствующих развитию фиброзов. При разработке практического применения этих фитогормонов надо учитывать подробно обсужденный автором работы факт, что действие этих веществ может сильно зависеть от клеточного контекста.

Результаты диссертационной работы Е.П. Турищевой полностью отражены в публикациях автора и были представлены на 5 российских и международных конференциях. По материалам диссертационной работы опубликовано 4 печатные работы в рецензируемых журналах, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus и рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности и отрасли наук и 5 тезисов докладов, сделанных на конференциях.

Высказанные мною замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация Е.П. Турищевой «Влияние растительных гормонов на дифференцировку культивируемых дермальных фибробластов человека» отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 1.5.22. Клеточная биология (по биологическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова, а также оформлена, согласно требованиям Положения о совете по защите

диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Таким образом, соискатель Турищева Екатерина Павловна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.22. Клеточная биология.

Официальный оппонент:

Доктор биологических наук,
ведущий научный сотрудник лаборатории механизмов канцерогенеза
Научно-исследовательского института канцерогенеза
Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный
медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина»
Министерства здравоохранения Российской Федерации


Александрова Антонина Юрьевна

Подпись А.Ю. Александровой заверяю
Ученый секретарь ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава РФ,
канд.мед.наук

31.10.2023


Кубасова И.Ю.

31.10.2023

Контактные данные: тел.: +7 (499) 323-53-11; e-mail: a.alexandrova@ronc.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена
диссертация: 03.03.04. Клеточная биология, цитология, гистология

Адрес организации:

115478, г. Москва, Каширское шоссе 24,
Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени
Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Тел.: 8-499-323-53-11; e-mail: a.alexandrova@ronc.ru,
<https://www.ronc.ru>