

ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических
наук Кулебякиной Марии Александровны на тему: «Механизмы
влияния белков, секретируемых мезенхимными стволовыми клетками,
на дифференцировку фибробластов в миофибробласты»
по специальности 1.5.4. Биохимия

Актуальность избранной темы.

Известно, что заболевания ассоциированные с развитием фиброза являются причиной около 20% всех случаев смертности в мире. Непосредственно фиброз представляет собой патологический процесс, при котором здоровая ткань замещается рубцовой, что способно приводить к ослаблению и затем к утрате тканями и органами своих функций. Ключевым патогенетическим звеном развития фиброза большинства тканей является избыточное образование миофибробластов – клеток, вносящих основной вклад в формирование рубцовой ткани, которые возникают преимущественно из резидентных фибробластов. В связи с этим, расшифровка молекулярных механизмов регуляции дифференцировки фибробластов в миофибробласты представляет собой важную задачу современной биологии и биомедицины.

Мезенхимные стволовые клетки (МСК) играют важную роль в регуляции многих клеточных процессов, протекающих в живом организме. Следует отметить, что значительная часть эффектов МСК обусловлена продукцией ими биологически активных белковых факторов. Показано, что МСК секретируют белки, способные стимулировать ангиогенез и прорастание нейритов, регулировать функционирование иммунных клеток, формировать и ремоделировать внеклеточный матрикс. Данные литературы свидетельствуют о том, что МСК за счёт паракринных механизмов способны также препятствовать избыточному образованию миофибробластов из

фибробластов, однако роль растворимых белковых факторов, секретируемых МСК, в этом процессе не установлена. В связи с этим, актуальной задачей является исследование роли растворимых белковых факторов, секретируемых МСК, в регуляции процесса дифференцировки фибробластов в миофибробласты, а также изучение механизмов этого влияния. **В свете вышеприведенного диссертационная работа Кулебякиной Марии Александровны является важной и актуальной.**

Структура и объем работы. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, изложения полученных результатов, обсуждения результатов, заключения, выводов и списка цитированной литературы. Работа изложена на 105 машинописных листах, содержит 28 рисунков, 4 таблицы и 166 библиографических ссылок. В начале работы приведен список использованных в тексте сокращений.

Глава «Введение» посвящена описанию состояния проблемы, обоснованию актуальности диссертационного исследования, постановке цели и задач работы. В этой главе также описаны научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы и сформулированы положения, выносимые на защиту, приведен список опубликованных по теме диссертации работ.

Глава «Обзор литературы» занимает всего 19 страниц. Условно его можно разделить на три подраздела: Клеточные механизмы репаративной регенерации тканей, дифференцировка фибробластов в миофибробласты (включая описание сигнальных путей, участвующих в процессах дифференцировки фибробластов в миофибробласты), роль МСК в регуляции процессов заживления ткани. И хотя обзор достаточно краткий, он дает возможность понять существо проблемы, которой занимался автор. Кроме

того следует отметить качественный иллюстративный материал этой главы (7 рисунков), способствующий пониманию проблемы.

В главе «Материалы и методы» автор описывает схемы и протоколы проведенных экспериментов. Для решения поставленных задач был выбран адекватный набор современных методов молекулярной и клеточной биологии, биохимии и иммунологии. Среди которых следует отметить: культивирование первичных и иммортализованных клеток человека и их дифференцировка, электрофорез, иммуноблоттинг, иммуноцитохимию и иммунопреципитацию, получение секрета культивируемых клеток и их протеомный анализ, ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией, а также транскриптомный анализ на уровне единичных клеток. В целом материал, изложенный в этой главе, свидетельствует о методической подготовленности автора к решению задач настоящей работы.

В главе «Результаты» автор последовательно излагает полученные результаты. Автор сфокусировал свое внимание на белках секрета МСК и их влиянии на дифференцировку фибробластов в миофибробласты. В ходе работы М.А.Кулебякиной удалось получить суммарную секреторную фракцию МСК, затем разделить и охарактеризовать ее компоненты. Согласно результатам, проведенного автором протеомного анализа, в полученных фракциях секрета около 80% всех идентифицированных белков (412 из 518 белков) являются секретируемыми. Это даёт основания предполагать, что изучаемые нами эффекты данных фракций в значительной степени опосредованы именно секретируемыми белками. После разделения секрета на фракции растворимых белков и внеклеточных везикул было проведено исследование их влияния на дифференцировочный потенциал фибробластов *in vitro*. Автором было продемонстрировано, что фракция растворимых белковых факторов секрета МСК обогащена белками, способными регулировать канонические сигнальные пути TGF- β , Wnt и Notch. Важным результатом проведенных исследований явилось

установление феномена ингибирования канонического сигнального пути Wnt в фибробластах под действием растворимой белковой фракции секрета МСК. Более того в этой фракции был идентифицирован белок DKK3, который ответственен за подавление кий сигнального пути Wnt в фибробластах, что и препятствует дифференцировке фибробластов в миофибробласты. Еще одним интересным результатом данной диссертационной работы явилось установление активации сигнального пути NF-κB в фибробластах под действием тотальной фракции белков секрета МСК. В целом данный раздел работы описан достаточно подробно и хорошо иллюстрирован.

Основные полученные результаты и их оригинальность. В результате проведенной работы М.А.Кулебякиной были получены важные и оригинальные результаты. Так автором, впервые было показано, что фракция секрета МСК человека, обогащенная растворимыми белками, препятствует дифференцировке фибробластов кожи человека в миофибробласты *in vitro* сильнее, чем тотальная фракция секрета, причем такой эффект опосредован белками, оказывающими влияние на канонический сигнальный путь Wnt. Белки этой фракции снижали базальный уровень активации канонического сигнального пути Wnt в фибробластах кожи человека в модели миофибробластной дифференцировки *in vitro*. Впервые было показано, что именно белок DKK3 этой фракции вносит существенный вклад в подавление дифференцировки фибробластов в миофибробласты *in vitro*. Кроме того, автором было показано, что тотальная фракция секрета МСК обогащена белками, способными активировать транскрипционный фактор NF-κB, и при добавлении к фибробластам в модели миофибробластной дифференцировки *in vitro* активирует NF-κB-зависимый сигнальный путь.

В главе «Обсуждение результатов» автор последовательно проводит обсуждение полученных в ходе работы результатов в сравнении с

результатами, полученными в других лабораториях с указанием на новизну и приоритетность собственных данных.

В главе «Заключение» автор кратко суммирует итоги проведенной работы и приводит схему установленного в настоящей работе влияния белков фракций секрета МСК на дифференцировку фибробластов в миофибробласты (рис.28).

Теоретическая и практическая значимость работы. Теоретическая и фундаментальная значимость настоящей работы заключается в получении новых и приоритетных данных относительно механизма антифибротического действия фракции растворимых белковых факторов секрета МСК. Полученные в данной работе результаты указывают на необходимость контроля уровня ряда компонентов в его составе, активирующих в клетках-мишенях провоспалительные сигнальные пути, что важно при разработке терапевтических подходов с использованием секрета этих клеток. Результаты исследования могут быть использованы для разработки новых подходов к лечению заболеваний, связанных с фиброзом, ключевым звеном патогенеза которых является дифференцировка фибробластов в миофибробласты, а также некоторых заболеваний, связанных с образованием хронических язв. Полученные автором результаты могут быть использованы при чтении соответствующих лекций на Медицинском и Биологическом факультетах МГУ им. М. В. Ломоносова, а также ряде медицинских университетов нашей страны.

Степень достоверности полученных результатов. Постановка цели и задач данного исследования, а также выбор методик и протоколов, необходимых для решения поставленных задач, основаны на анализе актуальных публикаций по теме исследования. Достоверность представленных результатов обусловлена воспроизводимостью измерений, проведенных в необходимом количестве биологических повторностей.

Следует отметить, что постановка всех проведённых экспериментов проводилась в соответствии с современными правилами проведения научных исследований: постановка контрольных экспериментов с учётом специфики выполняемой работы, статистическая обработка результатов с использованием подходящих критериев для каждого типа полученных экспериментальных данных.

Выводы диссертации обоснованы и логично вытекают из полученных результатов и их обсуждения.

Принципиальных замечаний по диссертационной работе не имеется. Замечания и предложения по работе не имеющие принципиального характера.

1. На мой взгляд, в списке литературы автору следовало бы привести doi для статей, чтобы облегчить их поиск в интернете.
2. С.33. Нет характеристики клеточной культуры первичных фибробластов, используемых в работе, включая пассажи и указания донора и его возраста.
3. С.48. Методика «Приготовление образцов для анализа транскриптома одиночных клеток» описана, на мой взгляд, недостаточно подробно. Непонятно, каким образом клетки переводили в суспензионное состояние, если это прикрепляющаяся культура. И, если это так, то как это сказывалось на изменении экспрессии генов в этих клетках?

Аннотация полностью соответствует содержанию диссертации. По материалам диссертации опубликовано 5 печатных работ. Результаты работы доложены на 8 Российских и международных конференциях.

Заключение. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует

специальности 1.5.4. Биохимия (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, на соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Таким образом, соискатель Кулебякина Мария Александровна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

Официальный оппонент:
доктор биологических наук, профессор,
главный научный сотрудник Лаборатории молекулярной
нейрогенетики и врожденного иммунитета
Национального исследовательского центра
«Курчатовский институт»

ГРИВЕННИКОВ Игорь Анатольевич

«____» марта 2025 г.

Контактные данные:
тел.: 8499-1960014, e-mail:

Специальность, по которой защищена диссертация: 1.5.3. – молекулярная биология; 3.3.6. – фармакология, клиническая фармакология.

Адрес места работы:
123182, г. Москва, пл. ак. Курчатова, д.2, Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт» (НИЦ «Курчатовский институт»)

Подпись Гривенникова И.А. удостоверяю:
Главный Ученый секретарь
Национального исследовательского центра
«Курчатовский институт»

О.А. Алексеева

«____» марта 2025 г.