

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

Работа М.А. Кулебякиной посвящена важной и интересной проблеме – выяснению роли растворимых белковых факторов, секретируемых мезенхимными стволовыми клетками (МСК), в регуляции процесса дифференцировки фибробластов в миофибробласты. Нарушение регуляции этого процесса при заживлении повреждённых тканей приводит к различным патологическим состояниям. Так, сниженное образование миофибробластов существенно замедляет процесс заживления ран и способно приводить к образованию хронических язв. Напротив, избыточное образование миофибробластов из фибробластов может приводить к развитию фиброза – патологического состояния, при котором здоровая функциональная ткань замещается рубцовой тканью, что постепенно приводит к утрате органами своих функций. Однако влияние белков, секретируемых МСК, на процесс дифференцировки фибробластов в миофибробласты, необходимый для успешного заживления повреждённой ткани, на настоящий момент еще не было изучено. Именно это и явилось главной целью работы, проведенной М.А. Кулебякиной. В связи с этим **актуальность, новизна и практическая значимость** данной работы не вызывают никаких сомнений.

Диссертация построена по общепринятой схеме. Она состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитированной литературы, включающего 166 ссылок. Работа изложена на 105 страницах и хорошо иллюстрирована 28 рисунками и 4 таблицами.

Обзор литературы безусловно заслуживает особого внимания и отдельного рассмотрения как самостоятельная глава диссертации. В нем сначала рассматриваются клеточные механизмы репаративной регенерации тканей, включая процесс дифференцировки фибробластов в миофибробласты. Затем подробно рассматриваются различные сигнальные пути, регулирующие процесс этой дифференцировки, такие как канонические сигнальные пути TGF- β , WNT и NOTCH, а также сигнальный путь NF- κ B. И, наконец, в последнем разделе обзора рассматривается роль мезенхимных стволовых клеток (МСК) и секретируемых ими белков в регуляции процессов заживления ткани. В целом, обзор литературы производит очень хорошее впечатление. Он написан хорошим языком, четко и логично, содержит ссылки на публикации последних лет, читается с большим интересом и наглядно свидетельствует о том, что диссертант прекрасно ориентируется в имеющейся литературе по рассматриваемым вопросам. Помимо этого, обзор полностью выполняет и свою главную функцию – он хорошо готовит читателя к последующему восприятию экспериментального материала.

Экспериментальная часть работы начинается с описания **материалов и методов исследования**, включающего как методы классической биохимии (различные виды электрофореза и пр.), так и целый ряд методов молекулярной биологии, иммуноцитохимии и клеточной биологии, таких, как ПЦР в реальном времени, иммуноцитохимическое окрашивание белков, хромато-масс-спектрометрический анализ с последующей биоинформатической обработкой данных и др., а также моделирование дифференцировки фибробластов в миофибробласты. Такое успешное сочетание самых разных методов исследования является, безусловно, важной особенностью данной работы. Последующее ознакомление с результатами проведенного исследования убедительно свидетельствует о том, что диссертант в совершенстве владеет всеми этими методами.

Глава «**Результаты**» состоит из 7 разделов. В первых из них подробно описывается разработанная автором диссертации методика разделения белков, секретируемых мезенхимными стволовыми клетками (МСК), на фракции растворимых белков и внеклеточных везикул. Полученные данные убедительно свидетельствуют о том, что используемая методика позволяет эффективно удалить везикулярные белки из секрета МСК и получить фракцию растворимых белков секрета, обогащенную белками, препятствующими дифференцировке фибробластов в миофибробласты.

В нескольких последующих разделах описываются данные, свидетельствующие о том, что некоторые белки этой фракции способны оказывать заметное влияние на канонические сигнальные пути TGF- β , Wnt и Notch, регулирующие процесс дифференцировки фибробластов в миофибробласты. Особый интерес (для меня, по крайней мере!) вызывают те из них, где рассматриваются растворимые белки этой фракции, способные подавлять канонический сигнальный путь Wnt в фибробластах, и среди них – белок DKK3 (белок 3 семейства Диккопф). Согласно полученным результатам, представленным на рис. 23, фракция растворимых белков секрета МСК, обедненная по этому белку, в значительной степени теряет способность препятствовать дифференцировке фибробластов в миофибробласты. На основании этих данных сделано вполне обоснованное заключение о том, что белок DKK3 в составе фракции растворимых белков секрета МСК препятствует такой дифференцировке, причем механизм действия этого белка связан с подавлением канонического сигнального каскада Wnt.

И, наконец, в двух последних разделах «Результатов» описываются данные, свидетельствующие о том, что некоторые белки тотальной фракции белков секрета МСК (в таблице 4 приводятся данные о 4 таких белках), содержание которых в этой фракции намного превышает их содержание во фракции растворимых белков секрета, способны активировать сигнальный

путь NF-κB и тем самым стимулировать дифференцировку фибробластов в миофибробласты.

Немалый интерес представляет глава «Обсуждение», в которой автор творчески анализирует полученные в работе результаты, сопоставляя их с данными, известными из литературы. Эта глава прекрасно проиллюстрирована двумя выразительными схемами, отражающими как регуляцию канонического сигнального пути Wnt белками, которыми обогащена фракция растворимых белков секрета МСК (белки LAMA2 и ISLR, которые, по данным литературы, способны активировать данный сигнальный путь, и белок DKK3, который, согласно результатам данной работы, ингибирует его) (рис. 26), так и активацию сигнального пути NF-κB в фибробластах под действием компонентов тотальной фракции белков секрета МСК (рис. 27). Особенно интересна приведенная здесь полемика автора с данными литературы по поводу того, какой эффект, активацию или ингибирование канонического сигнального пути Wnt, оказывает добавление к клеткам белка DKK3. Я, пожалуй, полностью согласен с высказанным автором предположением, что то, какой именно эффект оказывает белок DKK3 на этот сигнальный путь в клетках-мишенях, может определяться в значительной степени именно типом этих клеток.

Диссертация завершается небольшим заключением, в котором автор кратко подводит главные итоги проделанной работы, иллюстрируя их наглядной схемой (рис. 28), демонстрирующей различное влияние белков секрета МСК на дифференцировку фибробластов в миофибробласты – ингибирование (белок DKK3) или активацию (белки AKR1C3, MIF, MFAP4 и SDF-1) этого процесса.

В целом, у меня сложилось очень хорошее впечатление от рассматриваемой диссертационной работы, которая наглядно свидетельствует о способности ее автора как к творческому сопоставлению получаемых результатов с имеющимися в литературе данными и представлениями по рассматриваемым вопросам, так и к критическому

анализу собственных результатов. Материал диссертации изложен хорошим языком, четко и логично, а количество обнаруженных опечаток совсем невелико. У меня возникло лишь несколько замечаний и вопросов к описанию результатов работы и оформлению диссертации, не имеющих, в общем-то, принципиального характера и не затрагивающих суть проведенного автором исследования и сделанных на его основе выводов:

1). стр. 20, строка 11 сверху: "высококсервативный". Здесь пропущена буква "н", надо "высококонсервативный".

2). стр. 49: "...суспензию клеток ресуспендировали в 10 мМ буфере HEPES, pH 7.9, содержащем 0,5 мМ дитиотреитола и 0,5 мМ фенилметилсульфонилфторида.....". Имелся в виду 0,5 мМ дитиотреитол и 0,5 мМ фенилметилсульфонилфторид (т.е. 0,5 миллимолярный дитиотреитол и 0,5 миллимолярный фенилметилсульфонилфторид).

3). стр. 60, строки 1-3 сверху: "...Результаты протеомного анализа позволили обнаружить 59 таких белков: 21 белок, детектированный только во фракции РФ-МСК (рис. 5 Б), а также....". Это явная ошибка, на рис. 5Б в диссертации никаких результаты протеомного анализа нет. Скорее всего, здесь имеется в виду рисунок 14Б на стр. 58 диссертации (он же – рис. 3Б на стр. 15 автоеферата). Так ли это? Кроме того, имеется некоторое разночтение между текстом на стр. 60, где указано, что во фракции растворимых белков секретома МСК удалось обнаружить 21 белок, и рисунком 14Б, согласно которому в этой фракции идентифицировано 20 белков. Куда же исчез ещё один белок из этой фракции? Хотелось бы узнать мнение автора по этим вопросам.

4). На мой взгляд, было бы очень интересно получить рекомбинантный белок DKK3 и исследовать его непосредственное влияние на процесс дифференцировки фибробластов в миофибробласты. Делались ли такие попытки? или же они запланированы на будущее? В диссертации ответов на эти вопросы я не нашел.

Легко заметить, что все высказанные вопросы и замечания либо касаются оформления диссертации, либо носят сугубо полемический характер, нисколько не влияя при этом на общую высокую оценку выполненной М.А. Кулебякиной диссертационной работы.

Подводя итоги, следует сказать, что рецензируемая диссертационная работа представляет собой полноценное завершённое исследование, выполненное на высоком экспериментальном уровне, с привлечением целого ряда современных методов, при помощи которых получены новые важные и оригинальные данные. В целом, диссертационная работа М.А. Кулебякиной производит самое благоприятное впечатление, её безусловно можно охарактеризовать как работу весьма высокого класса. Полученные данные имеют большое теоретическое и практическое значение для дальнейших исследований в рассматриваемой области; достоверность этих данных сомнений не вызывает. Основные положения, выносимые на защиту, как и выводы, сделанные в диссертации, хорошо обоснованы, убедительны и вполне соответствуют полученным результатам. Материалы диссертации достаточно полно отражены в 5 статьях, опубликованных как в международных рецензируемых журналах с достаточно высокими импакт-факторами – таких, как "International Journal of Molecular Sciences" (IF=4,9), "Frontiers in Cell and Developmental Biology" (IF=4,6), "Biochemical and Biophysical Research Communications" (IF=2,5) и "Biomedicines" (IF=3,9), так и в отечественном журнале "Bulletin of Experimental Biology and Medicine" (IF=0,9), а также доложены на многочисленных симпозиумах и конференциях. Следует отметить, что в одной из этих статей, опубликованной в 2024 году в международном журнале "International Journal of Molecular Sciences", М.А. Кулебякина является первым автором, что подчеркивает её ведущую роль в этой работе. Важно также отметить, что в 2024 г. была принята к публикации в отечественном журнале "Биохимия" ("Biochemistry(Moscow)", Supplement Series B: Biomedical Chemistry) статья, имеющая самое прямое отношение к представленным в рассматриваемой

диссертации материалам, в которой М.А. Кулебякина является первым автором, что опять-таки подчеркивает её ведущую роль в этой работе. Представленный автореферат диссертации по содержанию полностью соответствует диссертации.

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,
заведующий лабораторией структурной биохимии белка ФГУ Федеральный
исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук (Институт биохимии им. А.Н. Баха)

ЛЕВИЦКИЙ Дмитрий Иванович

28 февраля 2025 г.

Контактные данные:

тел.: 7(495)9521384, e-mail: levitsky@inbi.ras.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена
диссертация: 03.01.04 – Биохимия

Адрес места работы:

119071, г. Москва, Ленинский проспект, д.33, стр. 2, Федеральный
исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук, Институт биохимии им. А.Н. Баха (ИНБИ),
лаборатория структурной биохимии белка
Тел.: 7(495)9521384; e-mail: levitsky@inbi.ras.ru

Подпись д.б.н., проф. Д.И. Левицкого удостоверяю:

Ученый секретарь ФИЦ биотехнологии РАН,
кандидат биологических наук

А.Ф. Орловский

28 февраля 2025 г.