

## **ОТЗЫВ**

**официального оппонента на диссертационную работу Рубиной Ксении Андреевны на тему «Т-кадгерин в процессах роста, ремоделирования кровеносных сосудов и опухолевой прогрессии», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.03.04. – клеточная биология, цитология, гистология**

### **Актуальность темы исследования.**

Сосудистая система млекопитающих находится в состоянии динамического равновесия, процессы роста или регрессии сосудов сложно координируются, а нарушение регуляции процессов ангиогенеза приводит к различным патологиям. В основе самых распространенных заболеваний: сердечно-сосудистых и онкологических, лежит либо недостаточный, либо избыточный ангиогенез. Кроме этого, все регенеративные процессы сопровождаются ангиогенезом, а попытки управлять этим процессом дают надежду на повышение эффективности лечения ряда заболеваний. Именно поэтому экспериментальные исследования, направленные на понимание клеточных механизмов регуляции сосудистого русла в процессе развития, физиологического функционирования и патологических процесса являются актуальными.

В последнее время помимо основных молекул, регулирующих процессы роста сосудов таких как факторы роста, цитокины и хемокины, активно изучаются навигационные рецепторы, которые определяют направление роста сосудов. Помимо контролирования траектории роста сосудов в эмбриогенезе и регенерации, навигационные молекулы играют важную роль при патологии.

Т-кадгерин является навигационной молекулой, для которой ранее было обнаружено участие в регуляции роста аксонов. Во взрослом организме человека Т-кадгерин экспрессируется в сердечно-сосудистой и нервной системах, повышение его экспрессии наблюдается при различных заболеваниях. Функция Т-кадгерина в сосудах до сих пор неизвестна. Изучение роли Т-кадгерина в процессах физиологического и патологического ангиогенеза, ремоделирования сосудов важно для понимания фундаментальных механизмов морфогенетических процессов в эмбриогенезе и во взрослом организме, а также для решения современных задач регенеративной медицины.

### **Научная новизна исследований и полученных результатов.**

В результате проведенных исследований впервые получены данные о том, что Т-кадгерин участвует в регуляции процессов ангиогенеза. Используя методы *in situ* гибридизации и иммунофлуоресцентного окрашивания целых эмбрионов в сочетании с

конфокальной микроскопией, в настоящей работе впервые получены данные об экспрессии мРНК и белка Т-кадгерина в развивающемся головном мозге и в сердце в раннем эмбриональном развитии у мыши на этапах активного формирования этих органных структур и их васкуляризации.

Использование различных экспериментальных подходов и моделей *in vivo*, *in vitro* и *ex vivo* позволило получить ранее не известные данные, свидетельствующие о том, что Т-кадгерин ингибирует начальные этапы ангиогенеза, но не влияет на процессы созревания сосудов. Эффекты Т-кадгерина реализуются на уровне подавления миграции эндотелиальных клеток и процессов формирования, роста и ветвления капилляроподобных трубочек. Т-кадгерин не влияет на пролиферацию, адгезию и апоптоз эндотелиальных клеток. В основе эффектов Т-кадгерина лежит гомофильное взаимодействие между молекулами Т-кадгерина на клетках.

Несмотря на обнаруженный антиангиогенный эффект Т-кадгерина как в физиологических условиях, так и при опухолевом росте, в настоящей работе получены результаты, указывающие на то, что Т-кадгерин не может считаться фактором опухолевой супрессии. На клетках меланомы продемонстрировано, что при гиперэкспрессии Т-кадгерина активируются компенсаторные механизмы: они «включают» гены, способствующие их большей выживаемости, миграции и инвазии, а также начинают секретировать хемокины, молекулы адгезии, протеазы и факторы роста, способствующие привлечению мезенхимных стромальных клеток, что способствует опухолевому росту и метастазированию.

Впервые обнаружено, что Т-кадгерин влияет на проницаемость эндотелиального монослоя, снижая его барьерную функцию при гиперэкспрессии. Впервые раскрыты биохимические и молекулярно-биологические механизмы участия Т-кадгерина в регуляции проницаемости эндотелия, связанные с активацией малых Rho ГТФаз, перестройкой актинового цитоскелета и микротрубочек, интернализацией VE-кадгерина с поверхности мембраны и его деградацией в лизосомах.

Впервые показано, что помимо гомофильного взаимодействия Т-кадгерин способен связывать липопротеиды низкой плотности (ЛНП). Являясь специфическим низкоаффинным рецептором ЛНП, Т-кадгерин опосредует сигнальные эффекты ЛНП в клетках. Связывание ЛНП с мембранами клеток вызывает повышение внутриклеточной концентрации  $Ca^{2+}$  за счет его выход из эндоплазматического ретикулума и увеличивает миграцию клеток по градиенту ЛНП.

Таким образом, проведенные в данной работе исследования внесли существенный вклад в расширение системы фундаментальных знаний о роли и функционировании навигационных рецепторов в процессах ангиогенеза в норме и при патологии.

#### **Достоверность результатов и обоснованность выводов.**

Использование комплекса современных методов: *in situ* гибридизации и иммунофлуоресцентного окрашивания целых эмбрионов в сочетании с конфокальной микроскопией, биохимических и молекулярно-биологических методов, физиологических и клеточно-биологических подходов как в процессах физиологического ангиогенеза на моделях *in vitro*, *in vivo* и *ex vivo*, так и при опухолевом неоангиогенезе была охарактеризована функция Т-кадгерина как навигационной молекулы. В работе показано, что в основе антиангиогенных эффектов лежит гомофильное взаимодействие между молекулами Т-кадгерина на контактирующих клетках, что было продемонстрировано с использованием клеточных и органных культур, а также рекомбинантных доменов Т-кадгерина. Для выявления функции Т-кадгерина в зрелых сосудах изучали влияние гиперэкспрессии или подавления экспрессии Т-кадгерина (с помощью аденовирусных и лентивирусных конструкций) на проницаемость эндотелия. Использование методов клеточного фракционирования, электрофореза и иммуноблоттинга, иммунофлуоресцентного окрашивания в сочетании с конфокальной микроскопией позволило выявить основные белки-участники сигнального каскада, запускаемого с участием Т-кадгерина в эндотелиальных клетках, а также механизмы повышения проницаемости в виде эндоцитоза VE-кадгерина и перестройки цитоскелета. Методом иммуногистохимического окрашивания было обнаружено, что экспрессия Т-кадгерина повышается в сосудах с атеросклеротическими поражениями, что коррелирует с накоплением липидов в сосудистой стенке. Анализ параметров специфического связывания меченных ЛНП с поверхностью клеток позволил получить результаты, свидетельствующие о том, что Т-кадгерин является рецептором ЛНП, который опосредует  $Ca^{2+}$ -сигнализацию и направленную миграцию клеток по градиенту концентрации ЛНП. Основные положения диссертационной работы получены автором с использованием нескольких методов.

Соискатель имеет 100 опубликованных работ, в том числе по теме диссертации 47 работ в рецензируемых научных изданиях, из них 16 статей в российских и зарубежных реферируемых научных журналах, 6 глав в книгах и сборниках, тезисы 24 докладов на научно-практических конференциях и конгрессах, 1 патент на изобретение. Опубликованные работы включают 11 статей в российских журналах из перечня ВАК РФ, 10 статей аннотировано в базе Web of Science, 8- в базе Scopus, что подтверждает полноту

опубликования результатов диссертационного исследования. Достоверность полученных результатов подтверждается показателями цитируемости публикаций в системах РИНЦ, Web of Science, и Scopus - 356; индекс Хирша – 7. Результаты диссертации были доложены на международных и российских конференциях, в том числе с международным участием.

Изложенные в диссертации научные результаты получены лично соискателем и вклад автора в представленных публикациях является ведущим. Публикации результатов в высокорейтинговых научных журналах, а также показатели цитируемости работ Рубиной К.А. подтверждают их высокий научный уровень.

По результатам работы сформулировано 7 выводов. Выводы диссертации четко обоснованы и логично вытекают из описания проведенных экспериментов и обсуждения полученных результатов.

#### **Практическая значимость полученных результатов.**

Исследование Т-кадгерина при различных патологических состояниях, моделирование процессов инвазии и дисфункции эндотелия на животных и клеточных культурах не только вносит существенный вклад в понимание патогенеза различных заболеваний, но и дает толчок к поиску новых подходов к диагностике и лечению. Весьма важным с практической точки зрения является анализ экспрессии Т-кадгерина в кератиноцитах и нарушение его экспрессии в сосудах, которое коррелирует с процессами озлокачествления немеланомных новообразований кожи человека.

Использование различных экспериментальных подходов и моделей *in vivo*, *in vitro* и *ex vivo* позволило получить свидетельства того, что Т-кадгерин является навигационной молекулой, опосредующей негативное регулирование роста кровеносных сосудов. Т-кадгерин подавляет начальные этапы ангиогенеза, но не влияет на процессы созревания сосудов. Основным механизмом является гомофильное взаимодействие между молекулами Т-кадгерина на контактирующих клетках, в том числе стромальных клетках микроокружения.

Несмотря на обнаруженный антиангиогенный эффект Т-кадгерина как в физиологических условиях, так и при опухолевом росте, Т-кадгерин не может считаться фактором опухолевой супрессии, поскольку при гиперэкспрессии Т-кадгерина опухолевые клетки способны активировать компенсаторные механизмы, способствующие повышению их выживаемости, миграции, инвазии и метастазированию.

При ангиогенезе помимо вновь формирующихся сосудов Т-кадгерин экспрессирован в зрелых стабильных сосудах взрослого организма. Его экспрессия повышается при таких патологических состояниях с развивающейся эндотелиальной

дисфункцией. Впервые обнаружено, что T-кадгерин влияет на проницаемость эндотелиального монослоя: гиперэкспрессия T-кадгерина приводит к снижению барьерной функции эндотелия, а подавление T-кадгерина – наоборот. Раскрыты биохимические и молекулярно-биологические механизмы участия T-кадгерина в регуляции проницаемости эндотелия. Эффекты T-кадгерина развиваются путем активацией малых Rho ГТФаз, их нисходящих сигнальных посредников ROCK-II, LIMK и PAK1, за счет перестройки актинового цитоскелета и микротрубочек, интернализации VE-кадгерина с поверхности мембраны и его деградации в лизосомах.

В заключительной части работы показано, что помимо гомофильного взаимодействия T-кадгерин способен связывать ЛНП. Являясь специфическим низкоаффинным рецептором ЛНП, T-кадгерин опосредует сигнальные эффекты ЛНП в клетках - повышение внутриклеточной концентрации  $Ca^{2+}$  за счет его выход из эндоплазматического ретикула и активацию миграции клеток по градиенту ЛНП.

О новизне и практической значимости результатов данной работы свидетельствует полученный патент.

#### **Содержание работы.**

Диссертация изложена на 405 страницах машинописного текста, содержит 138 рисунков, 7 таблиц. Состоит из разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Список литературы». Библиография включает 581 ссылку.

В разделе «Введение» диссертант рассматривает основные морфогенетические процессы, происходящие в эмбриогенезе, и современные представления о генетических и эпигенетических механизмах морфогенеза во взрослом организме, делении и дифференцировке клеток, направленной клеточной миграции, построении архитектуры и поддержания целостности органов и тканей, обеспечении их кровоснабжением и иннервацией, формулирует цели и задачи исследования.

Обзор литературы объемный (95 стр.), очень подробный и содержит несколько глав. В первой части обзора рассматриваются основные клеточные, биохимические и молекулярно-биологические механизмы регуляция роста и ремоделирования кровеносных сосудов. При этом значительное внимание уделяется факторам роста, хемокинам, цитокинам, интегринам, протеазам, ингибиторам ангиогенеза и их роли в процессах ангиогенеза в норме и при патологии. Однако известно, что как в эмбриогенезе, так и при регенерации/репарации нервы и сосуды, после стимуляции роста соответствующими факторами, растут параллельно и по строго определенной траектории, которую задают навигационные рецепторы. Именно роли этих рецепторов в процессах нейро- и

ангиогенеза в норме и при различных заболеваниях посвящена вторая часть обзора литературы. В третьей части обзора анализируется роль семейства кадгерinov в процессах морфогенеза в эмбриогенезе и во взрослом организме, особое внимание при этом уделяется Т-кадгерину как нетипичному представителю семейства кадгерinov, экспрессия и сигнализация с участием которого изменяется при целом ряде патологий, связанных с процессами ангиогенеза и ремоделирования сосудов.

Материалы и методы диссертационной работы изложены достаточно подробно, занимают 40 стр. Экспериментальные результаты получены на современном сертифицированном оборудовании, работа выполнена на достаточном по объему материале и на высоком технологическом уровне с применением современных методов исследований в области биохимии, молекулярной и клеточной биологии, гистологии, эмбриологии и цитологии. Выполненная статистическая обработка полученных результатов позволяет говорить о достоверности обнаруженных различий и установленных закономерностей.

Раздел «Результаты и обсуждение» состоит из семи частей, каждая из которых заканчивается обсуждением результатов. В первой части работы автор исследует характер экспрессии Т-кадгерина в раннем эмбриональном развитии у мыши с использованием методов *in situ* гибридизации и иммунофлуоресцентного окрашивания целых эмбрионов в сочетании с конфокальной микроскопией.

Вторая и третья часть работы посвящена изучению экспрессии Т-кадгерина при онкологических заболеваниях. При этом автор анализирует экспрессию Т-кадгерина сначала при неопластических образованиях кожи человека, при немеланомных раках кожи и метастазирующей меланоме человека. Полученные данные свидетельствуют о корреляции между озлокачиванием новообразований кожи и потерей экспрессии Т-кадгерина. Для установления причинно-следственной связи между экспрессией Т-кадгерина и опухолевой прогрессией автор далее использует модель роста агрессивной меланомы у мышей, метастазирующей в легкие. Полученные данные свидетельствуют о важной роли Т-кадгерина в опухолевой прогрессии и неоангиогенезе.

Экспериментальные данные, полученные в четвертой части при изучении механизмов физиологического ангиогенеза на моделях *in vitro*, *in vivo* и *ex vivo* свидетельствуют о том, что Т-кадгерин является антиангиогенной молекулой и ингибирует ангиогенез на уровне подавления миграции эндотелиальных трубочек и формирования капилляро-подобных структур.

В пятой части работы для выявления функции Т-кадгерина в зрелых сосудах автором изучалось влияние гиперэкспрессии или подавления экспрессии Т-кадгерина на

проницаемость эндотелиального монослоя. Эндотелиальная дисфункция и снижение барьерной функции эндотелии часто сопутствует различным патологическим состояниям в сосудистой стенке. В шестой части работы обнаружено, что экспрессия Т-кадгерина повышается в зрелых сосудах с атеросклеротическими поражениями, для которых характерно ремоделирование сосудистой стенки, что также коррелирует с накоплением в ней липидов.

В седьмой части работы при анализе параметров специфического связывания меченных ЛНП с поверхностью клеток обнаружено, что повышение экспрессии Т-кадгерина увеличивает число сайтов связывания ЛНП с поверхностью клетки и опосредует активацию  $Ca^{2+}$ -сигнализации, а также усиливает направленную миграцию клеток по градиенту концентрации ЛНП. Каждая экспериментальная часть заканчивается разделом «Обсуждение результатов», в котором, как правило, приведены гипотетические схемы участия Т-кадгерина в физиологических или патологических процессах.

В заключении диссертационной работы резюмируется большой экспериментальный материал и предпринимается попытка обобщить действие известных к настоящему времени «навигационных молекул», включив в их число Т-кадгерин. Выводы, сделанные на основании полученных автором данных, обоснованы и отвечают поставленным задачам, а автореферат соответствует содержанию диссертации.

Диссертация написана хорошим литературным языком, хорошо структурирована и иллюстрирована, с интересом читается. Тем не менее, автор не избежал единичных опечаток (например, стр. 235), нескольких пунктуационных ошибок (стр.102, 152, 235, 259). Кроме этого, хотелось бы получить ответы на несколько вопросов, возникших при чтении работы. Почему после раздела «2.35 Статистическая обработка результатов», обычно завершающего главу «Материалы и методы», идет описание еще пяти методических приемов? Что обозначает красная линия на рис. 3.35 (описание в подрисуночной подписи отсутствует)? Какой национальный совет имеется в виду на стр. 125: «Содержание и использование лабораторных животных соответствовало рекомендациям национального совета и законам РФ»? Можно ли на основании имеющихся в настоящий момент экспериментальных данных и гипотетических предположений построить иерархическую систему «навигационных молекул»? Насколько велик вклад паракринной регуляции в эффективность функционирования «навигации» при ангиогенезе?

Высказанные замечания не носят принципиального, а поставленные вопросы являются дискуссионными и не снижают высокого уровня обсуждаемой диссертации, которая не только подводит итоги большой экспериментальной работы, но ставит новые

вопросы и открывает перспективы более глубокого понимания механизмов ангиогенеза и возможного использования новых знаний в практической медицине.

### **Заключение.**

Диссертация Рубиной Ксении Андреевны является научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных исследований разработаны теоретические положения о роли Т-кадгерина в ангиогенезе, опухолевой прогрессии, гиперплазии тканей, атерогенезе, регенеративных процессах, совокупность которых можно квалифицировать как научные достижения в области клеточной биологии, цитологии и гистологии, а полученные в данной работе результаты имеют не только теоретическое, но и важное научно-практическое значение для современной биологии и медицины.

Диссертационная работа Рубиной Ксении Андреевны на тему «Т-кадгерин в процессах роста, ремоделирования кровеносных сосудов и опухолевой прогрессии» по специальности 03.03.04. – клеточная биология, цитология, гистология по актуальности, новизне, научному и методическому уровню, теоретической и практической значимости, достоверности полученных результатов полностью соответствует п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, а диссертант заслуживает присуждения искомой степени доктора биологических наук по специальности 03.03.04 - клеточная биология, цитология, гистология.

Ученый секретарь Института,

Зав. лабораторией Клеточной физиологии ГНЦ РФ – ИМБП РАН,

д.м.н., проф., чл.-корр. РАН

Буравкова Людмила Борисовна

01 октября 2015 г.

Федеральное государственное учреждение науки  
Государственный научный центр Российской Федерации -  
Институт медико-биологических проблем  
Российской академии наук.  
123007, Москва, Хорошевское шоссе, 76-а.  
ГНЦ РФ – ИМБП РАН  
Тел. 8-499-195-6876, факс 8-599-195-2243.  
e-mail: buravkova@imbp.ru

Подпись заверена

Зам. директора по науке, д.б.н.



Сычев В.Н.

## Сведения об официальном оппоненте

Буравкова Людмила Борисовна, профессор, член-корреспондент РАН

Доктор медицинских наук, 14.03.08 авиационная, космическая и морская медицина

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр Российской Федерации – Институт медико-биологических проблем Российской академии наук (ГНЦ РФ – ИМБП РАН)

Ученый секретарь Института, зав. лаб. «Клеточной физиологии»

[buravkova@imbp.ru](mailto:buravkova@imbp.ru), 8-499-195-22-43

Основные публикации за 5 лет

1. Анохина Е.Б., Буравкова Л.Б. Механизмы регуляции транскрипционного фактора NF $\kappa$ B при гипоксии // Биохимия. 2010. Т. 75. № 2. С. 185-195.
2. Гершович П.М., Гершович Ю.Г., Буравкова Л.Б. Экспрессия генов цитоскелета в культуре мезенхимальных стромальных клеток человека на различных этапах моделирования эффектов микрогравитации. //Авиакосмическая и экологическая медицина. 2011, № 4, стр. 39-42.
3. Горностаева А.Н., Андреева Е.Р., Андрианова И.В., Буравкова Л.Б. Оценка иммуносупрессивных эффектов мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток при разном содержании O $_2$  в среде культивирования. // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2011, № 2, стр. 92-94.
4. Ударцева О.О., Андреева Е.Р., Буравкова Л.Б., Книжник А.В., Возовиков И.Н. Низкие дозы фотодинамического воздействия изменяют функциональные свойства клеток сосудистой стенки. // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2011, № 2, стр. 87-91.
5. Буравкова Л.Б., Григорьева О.В., Рыкова М.П. Взаимодействие культуры лимфоцитов человека и перевиваемой суспензионной культуры опухолевых миелобластов К-562 в условиях микрогравитации (космический эксперимент "Межклеточное взаимодействие"). // В кн. «Международная космическая станция. Российский сегмент». Том 2 «Космическая биология и медицина», 2011, стр.366 – 383.
6. Буравкова Л.Б., Андреева Е.Р., Григорьев А.И. Роль кислорода как физиологического фактора в проявлении функциональных свойств мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток человека// Физиология человека. – 2012. – Т.38. - №4. – с. 1-10.
7. Рылова Ю.В., Андреева Е.Р., Гогвадзе В.Г., Животовский Б.Д., Буравкова Л.Б. Этопозид и гипоксия не активируют апоптоз мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток *in vivo*. // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2012. - №3. – с. 148-151.
8. Андреева Е.Р., Буравкова Л.Б. Взаимодействие мультипотентных мезенхимальных стромальных и иммунных клеток: двунаправленные эффекты // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2012. - №2. – с.1441- 1459.
9. Андреева Е.Р., Буравкова Л.Б. Паракринная активность мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток и ее особенности в условиях гипоксии. Физиология человека. 2013. Т. 39. №3. стр. 104-113.
10. Рылова Ю.В., Буравкова Л.Б.. Постоянное культивирование мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток при пониженном содержании кислорода. Цитология. 2013, Т.55, №12: 852-860.
11. Buravkova, L.B., Rylova, Y.V., Andreeva, E.R., Kulikov, A.V., Pogodina, M.V., Gogvadze, V., Zhivotovsky, B. Low ATP level is sufficient to maintain uncommitted state of multipotent

- mesenchymal stem cells // Biochimica et Biophysica Acta.- 2013.- № 1830, pp. 4418–4425.
12. Погодина М.В., Буравкова Л.Б. Экспрессия гипоксия-ассоциированных генов в мультипотентных мезенхимальных стромальных клетках из жировой ткани человека // Доклады академии наук. – 2013. – Т.458. - №2. – с. 233-235.
  13. Buravkova L.B., Andreeva E.R., Gogvadze V.G, Zhivotovsky B.D. Mesenchymal stem cells and hypoxia: Where are we? // Mitochondrion. – 2014. - № 19, pp. 105–112.
  14. Рудимов Е.Г., Буравков С.В., Андреева Е.Р., Буравкова Л.Б. Влияние провоспалительной активации на распределение F-актина культивируемых эндотелиальных клеток человека в условиях моделируемой микрогравитации. Клеточные технологии в биологии и медицине. 2014, №4, 260-267.
  15. Шубенков А.Н., Коровин С.Б., Андреева Е.Р., Буравкова Л.Б., Пустовой В.И. Модификация поверхности наночастиц кремния серебром или золотом снижает их биосовместимость in vitro. Цитология, 2014, 56(7): 511-515.
  16. Погодина М.В., Буравкова Л.Б. Особенности экспрессии *HIF-1α* в мультипотентных мезенхимных стромальных клетках при гипоксии. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2015, т.159, №3, 333-335.

## ОТЗЫВ

официального оппонента о диссертации Рубиной Ксении Андреевны «Т-кадгерин в процессах роста, ремоделирования кровеносных сосудов и опухолевой прогрессии», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

### **Актуальность темы исследования.**

Изучение морфогенетических процессов, обеспечивающих физиологическую регенерацию тканей и органов в постнатальном развитии, является одним из фундаментальных направлений современной биологии. Трудно переоценить роль в этом процессе, сосудистой системы, обеспечивающей гомеостаз тканей, снабжение их питательными веществами, кислородом, приток стволовых и иммунных клеток. Изучение ангиогенеза как в норме, так и при различных патологических состояниях представляет интерес не только для биологической науки, но и, несомненно, для практической, регенеративной медицины в таких ее областях как лечение инфарктов, ишемий, онкологических заболеваний, заболеваний опорно-двигательного аппарата и других патологий, связанных с деструктивными и пролиферативными процессами.

В этой связи диссертация Рубиной Ксении Андреевны, посвященная исследованию ангиогенеза в норме и патологии, а также роли Т-кадгерина, как молекулы отталкивания, актуальна и имеет значение для выяснения механизмов формирования и ремоделирования сосудов, а также для разработки способов регуляции и/или подавления роста сосудов при патологическом ангиогенезе.

### **Научная новизна исследований и полученных результатов.**

До настоящего времени оставалось неясным, экспрессируется ли Т-кадгерин в эмбриогенезе млекопитающих (где, как и в какое время), экспрессируется ли в сердечно-сосудистой системе взрослого организма, является ли он там, как и в нервной системе, навигационной молекулой. Не ясно было, несет ли он барьерную функцию в клетках эндотелия, и каков механизм сигналинга. Кроме того, не известна его роль в процессе нормального и патологического ангиогенеза, в частности, при атеросклерозе и канцерогенезе.

Поиску ответов на этот широкий спектр фундаментальных медико-биологических проблем посвящена диссертационная работа К.А. Рубиной. Диссертант блестяще справилась с поставленными задачами.

Она впервые показала, что экспрессия Т-кадгерина начинается на уровне мРНК и белка в развивающемся головном мозге и в сердце в раннем эмбриогенезе млекопитающих (мышей).

Ею установлено, что Т-кадгерин участвует в ангиогенезе и принадлежит к классу навигационных рецепторов, негативно регулирующих рост кровеносных сосудов. Т-кадгерин подавляет начальные этапы ангиогенеза, не влияя, однако, на их созревание. В основе эффектов Т-кадгерина лежит гомофильное взаимодействие между молекулами Т-кадгерина на контактирующих клетках.

К.А. Рубина впервые показала, что Т-кадгерин экспрессируется в норме в сосудах взрослого организма, и играет важную роль в проницаемости и барьерной функции эндотелия. Результаты работы свидетельствуют, что патологические состояния сопровождаются повышением экспрессии Т-кадгерина и снижением барьерной функции эндотелия, а подавление его экспрессии имеет обратный эффект. Выявлены молекулярно-биологические и биохимические механизмы, лежащие в основе Т-кадгерин-зависимой проницаемости эндотелия.

К.А. Рубиной выявлен антиангиогенный эффект Т-кадгерина при опухолевом росте. Однако, как справедливо отмечает диссертант, Т-кадгерин не является опухолевым

супрессором, поскольку на его гиперэкспрессию опухолевые клетки отвечают компенсаторными реакциями, облегчающими их выживаемость, миграцию, инвазию и метастазирование.

#### **Достоверность результатов и обоснованность выводов.**

По результатам работы сформулировано 7 выводов. Все они не вызывают сомнений в достоверности и хорошо обоснованы. Практически каждый факт получен с помощью методов, позволяющих оценить результат на различных уровнях – молекулярно-биологическом, цитохимическом и клеточном. О достоверности полученных результатов свидетельствует также использование диссертантом множества контролей, позволяющих с уверенностью сделать выводы из того или иного эксперимента.

#### **Практическая значимость полученных результатов.**

Помимо фундаментального аспекта, имеющего существенное значение для клеточной биологии, работа К.А. Рубиной представляет интерес и для практической медицины, поскольку знание механизмов ангиогенеза может служить основой для разработки методов его регуляции при широком круге заболеваний, связанных с сосудистой патологией. Кроме того, результаты, полученные К.А. Рубиной, могут быть рекомендованы для включения в курсы лекций студентам и аспирантам биологических и медицинских ВУЗ'ов.

#### **Содержание работы.**

Рубина провела весьма масштабное многоплановое исследование, стратегия его хорошо продумана и характеризуется глубиной подходов к разрабатываемой проблеме. Диссертация изложена на 405 страницах машинописного текста, содержит 138 рисунков, 7 таблиц. Состоит из разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Список литературы». Библиография включает 581 ссылку.

В литературном обзоре детально описаны молекулярно-биологические механизмы участия навигационных молекул в обеспечении формирования и организации нервной и сосудистой систем. Подробно охарактеризованы свойства навигационных молекул, регулирующих направленный рост и продвижение аксонов и эндотелиальных клеток. Все это свидетельствует о глубоком знании литературы и понимании проблемы, над которой работает диссертант.

Прекрасно представлена картина сопряженного развития нервной и кровеносной систем, в основе которого лежат общие механизмы навигации, участвующие в формировании, росте, и определении местоположения и соответствующих клеток в постнатальный период. Аксоны и сосуды используют одни и те же навигационные сигналы для выбора направления роста. Функционирование навигационных молекул определяется их структурными особенностями, наличием тех или иных доменов, обеспечивающих не только отталкивание или аттракцию, но и активацию сигнальных каскадов для тонкой настройки клеточной физиологии, а именно пролиферативную активность, выживание, апоптоз и пр.

Глава «Материалы и методы исследования» дает представление о громадном объеме проделанной работы и глубине анализа материала. Спектр использованных методов и моделей свидетельствует о высоком методическом уровне, на котором К.А. Рубина решала поставленные задачи.

Выдвинутая диссертантом гипотеза о принадлежности Т-кадгерина к категории навигационных молекул не только в нервной, но и в кровеносной системе, где он определяет направление роста новообразующихся сосудов, убедительно подтверждена с помощью разнообразных методических подходов. Показано, что экспрессия Т-кадгерина начинается уже в раннем эмбриогенезе, причем его функция заключается в негативной

регуляции роста сосудов. Не влияя на адгезию, пролиферацию и апоптоз эндотелиальных клеток, Т-кадгерин подавляет их миграцию и образование капилляров, но не оказывает воздействия на зрелые сосуды.

Подробно охарактеризованы функциональные особенности Т-кадгерина и описан механизм его действия. К.А. Рубина установила, что контактное ингибирование роста сосудов имеет место не только в модельных экспериментах *in vitro*, *in vivo* и *ex vivo*, но и в процессе малигнизации ткани.

К.А. Рубина показала, что повышенная экспрессия Т-кадгерина увеличивает проницаемость эндотелия, снижая тем самым его барьерную функцию, и выяснила биохимические механизмы регуляции проницаемости эндотелия. Она предположила, что усиление экспрессии Т-кадгерина может быть одной из причин развития сердечно-сосудистых заболеваний. Поэтому логичным продолжением этой части работы стало исследование связи Т-кадгерина с атеросклеротическим поражением сосудов. Полученные результаты позволили К.А. Рубиной заключить, что атеросклероз сопровождается усилением экспрессии в сосудистых клетках Т-кадгерина и что он является рецептором липопротеидов низкой плотности. Впервые показано, что эндотелиальные клетки-предшественники способны экспрессировать Т-кадгерин. В перспективе весьма интересно выяснить, являются ли они резидентными или мигрируют в область поражения из костного мозга.

Значительная часть работы посвящена подробному исследованию различных кожных патологий, начиная с хронических воспалительных процессов, таких как псориаз, и кончая опухолями разной степени злокачественности (солнечный кератоз, кератоакантома, базалиома, плоскоклеточная карцинома, метатипический рак). Если при псориазе Т-кадгерин стабильно экспрессируется во всех слоях кератиноцитов, в стромальных клетках и сосудах дермы, то малигнизация кожных новообразований сопровождается снижением экспрессии Т-кадгерина в кератиноцитах и нарушением его экспрессии в сосудах.

Весьма интересна часть работы, в которой на модели меланомы В16F10 раскрыт механизм влияния Т-кадгерина на опухолевую прогрессию. Как показала К.А. Рубина, важная роль в этом процессе принадлежит мезенхимным стромальным клеткам (МСК). Экспрессия Т-кадгерина, с одной стороны, подавляет неоваскуляризацию, способствуя образованию очагов некроза, а, с другой стороны, экспрессирующие Т-кадгерин клетки, выделяют хемотаксические факторы, привлекающие в опухоль МСК. В свою очередь, МСК в условиях создающейся гипоксии продуцируют хемоаттрактант (HGF), который связываясь с соответствующими рецепторами (с-Met) на клетках меланомы, стимулируют ее рост и метастатическую активность.

Заслуживает внимания разработка К.А. Рубиной нового методического приема, позволяющего на примере клеток клонов мышинной меланомы В16F10 оценить инвазивный потенциал в условиях *in vitro*. Предложенный ею метод двух капель Маригеля позволяет по изменению размеров капли и числу мигрирующих клеток судить о степени инвазивности клеточного клона.

Детально проведенные исследования позволили К.А. Рубиной охарактеризовать Т-кадгерин как многофункциональную молекулу, которая регулирует процесс ангиогенеза, при атеросклерозе выступает в качестве рецептора липопротеидов низкой плотности, а в зрелых сосудах функционирует как сигнальная молекула, регулирующая проницаемость эндотелиального монослоя.

Следует отметить, что полученные диссертантом данные прекрасно иллюстрированы. Сделаны очень информативные схемы, которые наглядно поясняют и дополняют текст.

#### **Замечания**

Представляется излишним описание результатов работы во «Введении».

Порядок представления результатов мог быть более логичным. Так, в главе «Результаты» после раздела «Выявление экспрессии Т-кадгерина в эмбриогенезе у мыши», следовало бы дать разделы «Выявление роли Т-кадгерина в процессах ангиогенеза», «Т-кадгерин и проницаемость сосудов. Сигнальные эффекты Т-кадгерина» и «Экспрессия Т-кадгерина в здоровых сосудах и в сосудах при атеросклерозе», и закончить главу разделом, посвященным исследованию роли Т-кадгерина при развитии опухолей, идя, таким образом, от нормы к патологии, а не наоборот.

Псориаз не стоит относить к предраковым состояниям. По своей природе он связан с хроническим воспалением, хроническим дерматозом, для которого характерна повышенная пролиферация кератиноцитов, макрофагов и лимфоцитов, а также избыточный ангиогенез. Значительную роль в патогенезе псориаза играет, по-видимому, иммунологическая составляющая.

### Заключение.

Диссертация Рубиной Ксении Андреевны является научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований разработаны теоретические положения, совокупность которых можно квалифицировать как новое научное достижение в области клеточной биологии, цитологии и гистологии. Выводы, сделанные на основании полученных автором данных, отвечают поставленным задачам, а автореферат соответствует содержанию диссертации.

Диссертационная работа Рубиной Ксении Андреевны на тему «Т-кадгерин в процессах роста, ремоделирования кровеносных сосудов и опухолевой прогрессии» по специальности 03.03.04. – клеточная биология, цитология, гистология по актуальности, новизне, научному и методическому уровню, теоретической и практической значимости, достоверности полученных результатов полностью соответствует п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, а диссертант заслуживает присуждения искомой степени доктора биологических наук по специальности 03.03.04 клеточная биология, цитология, гистология.

Заведующая лабораторией  
Клеточных и молекулярных основ гистогенеза  
ФГБУН Института биологии развития  
имени Н.К. Кольцова РАН  
Доктор биологических наук  
Е.И. Домарацкая  
Адрес: 119121, г. Москва, 1-й Вражский пер., д.4, кв.117  
Тел. 8-925-712-58-45, email: [edomar@mail.ru](mailto:edomar@mail.ru)

17.09.2015

Подпись д.б.н. Е.И. Домарацкой  
Заверяю  
Ученый секретарь  
ФГБУН Института биологии развития  
имени Н.К. Кольцова РАН  
Кандидат биологических наук  
Е.Б.Абрамова



*Edomar*

*[Handwritten signature]*

## СВЕДЕНИЯ

### Официальный оппонент :

ФИО – Домарацкая Елена Ивановна

Доктор биологических наук, 03.00.25 – гистология, цитология и клеточная биология

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН (ИБР РАН)

Зав. Лабораторией клеточных и молекулярных основ гистогенеза

Список публикаций за последние 5 лет по теме диссертации в рецензируемых научных изданиях

1. Домарацкая Е.И. / Стволовые клетки костного мозга. Преимущества, риски и перспективы клинического использования // Жизнь без опасностей. Здоровье. Профилактика. Долголетие. 2011. Т. 6. № 4. С.56-63.
2. Домарацкая Е.И. /Стволовые клетки – резиденты костного мозга // Известия Российской академии наук. Серия биологическая. 2011. № 3. С.261-272.
3. Молчанова Е.А., Буеверова Э.И., Старостин В.И., Домарацкая Е.И. / Чувствительность к действию факторов роста EGF, BFGF и PDGF субпопуляций мезенхимных стромальных клеток, происходящих из органов миелоидного кроветворения и отличающихся по времени проявления адгезивных свойств // Известия Российской академии наук. Серия биологическая. 2011. № 2. С.133-144.
4. Паюшина О.В., Старостин В.И., Домарацкая Е.И. / Клеточный состав и регуляторные функции стромы зародышевой печени // Цитология. 2012. Т. 54. № 5. С.369-380.
5. Grigoryan E.N., Poplinskaya V.A., Aleinikova K.S., Domaratskaya, E.I. Novikova Y.P., Anton H.J., Almeida E. / Signs of Müller Cell Gliotic response Found in the Retina of Newts Exposed to Real and Simulated Microgravity // Advances in Space Research (includes Cospar Information Bulletin). 2012. V. 49. N 10. С.1465-1471.
6. Паюшина О.В., Буторина Н.Н., Шевелева О.Н., Бухинник С.С., Домарацкая Е.И. / Клональный рост, фенотип и потенциал к дифференцировке мезенхимных стромальных клеток из кости плодов крысы // Доклады Академии наук. 2013. т. 453. № 5. С. 574-576.
7. Паюшина О.В., Буторина Н.Н., Шевелева О.Н., Домарацкая Е.И. / Сравнительный анализ субпопуляций мезенхимных стромальных клеток костного мозга и зародышевой печени, различающихся по чувствительности к 5-фторурацилу // Известия РАН. Серия биологическая. 2015. № 3. С. 1-7.
8. Паюшина О.В., Домарацкая Е.И. / Мезенхимные стромальные клетки как ресурс для регенерации // Жизнь без опасностей. Здоровье. Профилактика. Долголетие. 2014. №4. С.54-64.
9. Паюшина О.В., Домарацкая Е.И. /Гетерогенность и возможная структура популяции мезенхимных стромальных клеток // Цитология. 2015. Т. 57. № 1. С. 31-38.

Эл.адрес – edomar@mail.ru , раб. Тел. (495) 135-87-80

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Рубиной Ксении Андреевны на тему «Т-кадгерин в процессах роста, ремоделирования кровеносных сосудов и опухолевой прогрессии», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.03.04. – клеточная биология, цитология, гистология.

Диссертационная работа К.А. Рубиной посвящена исследованию роли одного из белков семейства кадгеринов, Т-кадгерина, в регуляции процессов ангиогенеза и васкулогенеза, определяющих функционирование клеточных систем организма в норме и при развитии патологии. Актуальность избранной диссертанткой темы не вызывает сомнений, так как изучение фундаментальных механизмов контроля ангиогенеза имеет первостепенное значение. Нарушения ангиогенеза определяют характер патологических изменений при развитии атеросклероза в сердечно-сосудистой системе. Ангиогенез также играет важнейшую роль в обеспечении прогрессивного роста злокачественных опухолей. Моноклональные антитела к факторам ангиогенеза, в частности, резко угнетают рост первичного опухолевого узла. С другой стороны, интравазация в кровеносные сосуды опухолевой стромы запускает процесс диссеминации неопластических клеток в организме, метастазирование в отдаленные органы и ткани.

Нужно сказать, что Т-кадгерин является одной из наименее изученных молекул в семействе кадгеринов. Уникальной особенностью Т-кадгерина, отличающей его от классических кадгеринов, опосредующих межклеточную адгезию, является отсутствие трансмембранного и цитоплазматического доменов. Т-кадгерин закреплен на мембране с помощью гликозилфосфатидилинозитольного "якоря" и напрямую не связан с системой актинового цитоскелета. Несмотря на имеющиеся в литературе данные о навигационном значении Т-кадгерина при развитии

нервной системы у птиц, ничего неизвестно о функционировании этой молекулы в эмбриогенезе млекопитающих.

При выполнении данной работы К.А. Рубиной впервые было экспериментально доказано негативное влияние Т-кадгерина на процесс образования новых кровеносных сосудов. Впервые идентифицированы молекулярные механизмы влияния Т-кадгерина на проницаемость эндотелия и его значение для нарушения барьерной функции эндотелия. Впервые получены данные о том, что в эндотелии Т-кадгерин активирует малые ГТФазы семейства Rho, эффекторы которых влияют на реорганизацию актинового цитоскелета и контрактильность актина-миозина. Впервые показано, что индуцируемая Т-кадгеринном дезорганизация VE-кадгериновых межклеточных адгезионных контактов в эндотелиальных клетках сопровождается клатрин-опосредованным эндоцитозом мембранного кадгерина. Диссертантка впервые детектировала включение экспрессии Т-кадгерина в головном мозге и сердечно-сосудистой системе млекопитающих на этапах раннего эмбрионального развития. Впервые показано, что экспрессия Т-кадгерина повышается в атеросклеротически пораженных сосудах.

Достоверность экспериментальных данных, полученных К.А. Рубиной, не вызывает сомнений, так как обеспечивается использованием самых современных методов и методик проведения исследований, корректной статистической обработкой полученных результатов. Достоверность полученных результатов подтверждается также публикациями в рецензируемых научных журналах, входящих в системы Web of Science и Scopus. Оригинальность и достоверность полученных данных подтверждена патентом РФ. Результаты работы неоднократно обсуждались на российских и международных конференциях и симпозиумах.

Полученные результаты безусловно важны для практической медицины, так как понимание механизмов, регулирующих ангиогенез, идентификация новых детерминант, влияющих на процесс метастазирования опухолевых клеток, позволяет выработать новые подходы к оптимизации и повышению эффективности химиотерапевтического и антиангиогенного лечения злокачественных новообразований. Полученные автором новые результаты важны также при разработке стратегии и новых подходов для профилактики и лечения сердечно-сосудистых заболеваний.

Диссертация К.А. Рубиной представляет собой фундаментальный труд, изложенный на 405 страницах машинописного текста, содержит 138 рисунков, 7 таблиц. Диссертационная работа построена по традиционному плану, и состоит из разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Список литературы». Библиография включает 581 ссылку.

Во введении диссертации приводятся убедительные доказательства актуальности выполненного исследования, новизны и практической значимости исследования. Четко сформулирована цель исследования, которая состояла в изучении роли T-кадгерина в процессах роста и функционирования кровеносных сосудов. Здесь же подробно изложены экспериментальные задачи исследования.

Обзор литературы хорошо написан, детально рассматривает основные проблемы, связанные с данным исследованием. В главе «Регуляция роста и ремоделирования кровеносных сосудов» подробно рассмотрены молекулярные и клеточные механизмы процессов ангиогенеза, ангиогенные факторы роста, роль хемокинов и цитокинов в процессах ангиогенеза. Подробно рассмотрены навигационные рецепторы в нервной и сердечно-сосудистой системе. Небольшая глава посвящена

кадгеринам, в том числе Т-кадгерину, при этом подробное описание литературных данных об изменениях экспрессии Т-кадгерина при патологических процессах почему-то переместилось из "Литобзора" в главу "Результаты и обсуждение", что вряд ли оправдано.

Глава "Материалы и Методы" хорошо написана и содержит подробное описание методик, использованных в работе. Подробно описаны процедуры и манипуляции с объектами, охарактеризованы моноклональные антитела, специфически выявляющие те или иные молекулы. Количество методов, освоенных автором при выполнении работы, впечатляет. Так для решения экспериментальных задач были созданы вирусные конструкции, конструкции малых интерферирующих РНК, получены линии, стабильно экспрессирующие трансфицированные векторы. Для анализа экспрессии Т-кадгерина в раннем эмбриональном развитии у мыши была использована гибридизация мышинных эмбрионов *in situ*. Иммуногистохимическое окрашивание срезов образцов было использовано для изучения распределения Т-кадгерина в клетках опухолей, сосудах стромы и атеросклеротических бляшках.

В главе "Результаты и обсуждение" собственные данные автора логично структурированы, хорошо представлены и проиллюстрированы.

Главным достижением данной работы, на мой взгляд, является то, что автору впервые удалось доказать роль Т-кадгерина в регуляции ранних стадий формирования кровеносных сосудов. Эти доказательства получены на нескольких экспериментальных моделях. Так на модели вставания сосудов в бляшку матригеля, имплантированного подкожно мышам, с использованием маркера эндотелиальных клеток CD31 было проанализировано влияние Т-кадгерина на плотность и размер растущих сосудов. Показано, что введение в матригель фибробластов, трансфицированных Т-кадгеринном, достоверно снижало количество

прорастающих сосудов, не влияя на количество зрелых сосудов, оцениваемых по окрашиванию на гладкомышечный  $\alpha$ -актин.

Для исследования способности Т-кадгерина ингибировать ангиогенез была использована модель формирования и роста капилляро-подобных трубочек в матрикеле эндотелиальными клетками HUVEC, эндогенно экспрессирующими Т-кадгерин. Были проведены сравнительные исследования результатов иммобилизации на поверхности матригеля рекомбинантных очищенных доменов Т-кадгерина: адгезивного EC1 домена и контрольного EC5 домена. Оказалось, что адгезивный домен Т-кадгерина резко угнетал формирование трубочек в матрикеле по сравнению с EC5 доменом. Сходные результаты были получены при изучении влияния доменов Т-кадгерина на формирование капилляро-подобных структур на модели сосудистого колечка крысы.

Автор задалась естественным вопросом, какие клеточные механизмы лежат в основе ингибирующего влияния Т-кадгерина на ангиогенез *in vivo* и получила на него совершенно определенный ответ. В этой части работы было исследовано влияние Т-кадгерина на межклеточную адгезию, пролиферацию, апоптоз и миграционную активность эндотелиальных клеток HUVEC. При расщеплении клеток HUVEC на монослой фибробластов, неэкспрессирующих и экспрессирующих Т-кадгерин, оказалось, что гиперэкспрессия Т-кадгерина в клетках монослоя не влияла на адгезию и пролиферацию эндотелиальных клеток. Однако при исследовании миграции эндотелиальных клеток в камере Бойдена через мембрану, покрытую рекомбинантными доменами Т-кадгерина, было обнаружено, что EC1 домен Т-кадгерина в отличие от EC5 домена резко подавлял миграцию клеток.

С использованием гибридизации *in situ* и иммунофлуоресцентного окрашивания эмбрионов антителами к Т-кадгерину автором была впервые

обнаружена экспрессия мРНК Т-кадгерина в формирующемся головном мозге эмбрионов мыши, начиная со стадии E8.75, и специфическое окрашивание белка, начиная со стадии E9.5. Автор обсуждает возможное участие Т-кадгерина в формировании сосудистых сплетений в стенках желудочков в развивающемся мозге, что, конечно, нужно доказывать параллельным окрашиванием сосудистых структур с использованием специфических маркеров. Экспрессия Т-кадгерина в эмбриональном сердце мыши впервые выявлена на стадии E11.5.

Хорошо известно, что наибольшая экспрессия Т-кадгерина во взрослом организме определяется в крупных стабильных сосудах. Ранее было показано, что экспрессия Т-кадгерина повышается при некоторых сердечно-сосудистых заболеваниях. В своей работе К.А. Рубина значительное внимание уделила исследованию роли Т-кадгерина в атеросклеротических поражениях сосудов. На криосрезах образцов аорты с помощью иммуногистохимического окрашивания антителами к Т-кадгерину было обнаружено значительное увеличение экспрессии Т-кадгерина в атеросклеротически измененных сосудах.

В работе К.А. Рубиной впервые показано, что Т-кадгерин играет важную роль в регуляции проницаемости эндотелиального монослоя. В этой части работы были созданы вирусные конструкции для гиперэкспрессии Т-кадгерина и подавления эндогенной экспрессии Т-кадгерина в эндотелиальных клетках. Было обнаружено, что меченный флуоресцентным красителем декстран существенно быстрее проникает через монослой клеток, гиперэкспрессирующих Т-кадгерин, по сравнению с контрольными клетками, в то время как подавление экспрессии эндогенного Т-кадгерина посредством РНК интерференции, напротив, снижает прохождение декстрана через монослой.

С помощью конфокальной микроскопии клеток, окрашенных антителами к VE-кадгерину, авторы обнаружили дезорганизацию межклеточных адгезионных контактов клеток HUVEC, оверэкспрессирующих T-кадгерин. Автору удалось показать, что дезорганизация межклеточных адгезионных контактов в таких клетках опосредована фосфорилированием VE-кадгерина по Y731 остатку тирозина цитоплазматического домена и сопровождается клатрин-опосредованным эндоцитозом мембранного кадгерина. В работе было убедительно доказано, что влияние T-кадгерина на барьерную функцию эндотелиальных клеток связано с активацией малых ГТФаз семейства Rho, эффекторы которых стимулируют сборку актиновых стресс-фибрилл в клетках. Усиление контрактильности акто-миозинового цитоскелета в клетках с выраженными стресс-фибриллами вызывает нестабильность межклеточных адгезий.

Значительная часть работы К.А. Рубиной посвящена исследованию участия T-кадгерина в развитии опухолевых новообразований. Данные о влиянии T-кадгерина на процесс малигнизации и опухолевый неоангиогенез противоречивы и не позволяют составить сколько-нибудь определенное мнение относительно его значения для опухолевого роста и прогрессии. В этой части работы К.А. Рубина получила новые интересные результаты.

Было проведено подробное иммуногистохимическое исследование срезов образцов кожи от здоровых пациентов, пациентов с псориазом, кератоакантомой, кератозом, различными формами базалиом, плоскоклеточным раком и базально-плоскоклеточным раком. Показано, что в доброкачественных опухолях и псориатических поражениях кожи экспрессия T-кадгерина сохранялась. В опухолевых узлах, в строме и в опухолевых кровеносных сосудах базалиомы с низкой скоростью роста и

малой инвазивностью экспрессия Т-кадгерина также сохранялась. В некоторых образцах нодулярной и инфильтрующей форм базалиом наблюдалось угнетение экспрессии Т-кадгерина. Существенное уменьшение окрашивания на Т-кадгерин было обнаружено в образцах умеренно и низкодифференцированных форм инвазивного плоскоклеточного рака. При окрашивании Т-кадгерина в образцах базально-плоскоклеточной карциномы обнаруживалось выраженное угнетение его экспрессии в опухолевых клетках. На основании полученных данных автор приходит к заключению о существовании коррелятивной связи между степенью злокачественности опухолей кожи и уровнем экспрессии Т-кадгерина. Снижение экспрессии Т-кадгерина в ходе опухолевой прогрессии также было обнаружено автором при сравнительном иммуногистохимическом исследовании образцов меланомы и метастазов меланомы у онкологических больных.

К методическим недостаткам этого раздела работы нужно отнести то, что при окрашивании правильнее было бы использовать антитела к маркеру эндотелиальных клеток CD31, так как использованные в работе антитела к фактору фон Виллебранда могут прокрашивать помимо сосудов опухолевые некротические массы, как это видно, например, на рисунке 3.18.

Наряду с иммуногистохимическим анализом образцов опухолей кожи и меланом автор решила исследовать влияние Т-кадгерина на модели опухолевого роста мышинной меланомы B16F10, метастизирующей в легкие, и получила результаты, которые на первый взгляд кажутся более сложными для интерпретации. На первом этапе работы автором были получены стабильно экспрессирующие Т-кадгерин линии меланомы B16. Оказалось, что экспрессия Т-кадгерина приводила к увеличению пролиферативной активности клеток меланомы *in vitro*. При исследовании

инвазии клеток в матрикеле было также обнаружено, что клетки меланомы B16, гиперэкспрессирующие Т-кадгерин, обладали более выраженными инвазивными характеристиками. Далее автор проводила сравнительные исследования влияния экспрессии Т-кадгерина на рост, метастазирование и васкуляризацию первичного узла меланомы B16 у мышей. Здесь также обнаружилось увеличение скорости роста первичной меланомы, образованной клетками, гиперэкспрессирующими Т-кадгерин, по сравнению с первичными узлами, образованными клетками контрольной линии. В опухолях, экспрессирующих Т-кадгерин, было обнаружено существенное снижение, по сравнению с контролем, количества сосудов среднего диаметра и капилляров, а также обширные области некротических поражений и значительный рост зон активированной стромы. Было обнаружено, что в группе мышей, которым были введены клетки меланомы B16 с высоким уровнем экспрессии Т-кадгерина, частота метастазирования была существенно выше, чем в контроле. Таким образом, при изучении опухолевого роста мышинной меланомы B16, метастизирующей в легкие, автор подтвердила свою гипотезу об ингибирующем влиянии Т-кадгерина на рост кровеносных сосудов. В работе также были проанализированы изменения экспрессии ряда белков и обнаружено, что в клетках B16F10, гиперэкспрессирующих Т-кадгерин, увеличивается экспрессия ингибиторов ангиогенеза и снижается экспрессия стимуляторов ангиогенеза, а также резко повышается уровень экспрессии рецептора HGF -с-met. Таким образом, на модели опухолевого роста мышинной меланомы B16F10, метастизирующей в легкие, автор исследовала молекулярные механизмы возможного участия Т-кадгерина в диссеминации опухолевых клеток.

Нужно отметить, что при изложении результатов работы в соответствующей главе собственные данные автора не только детально

проанализированы, но и сопоставлены с данными других авторов и это обсуждение подтверждает высокий теоретический уровень диссертантки. Заключение диссертации подводит итог этой многогранной работы. Сформулированы семь выводов, которые полностью отражают содержание работы.

Диссертация хорошо оформлена, не содержит фактических ошибок, хотя имеет некоторое количество опечаток, неудачных выражений и англицизмов, таких, например, как " сердце-формирующие регионы" (стр. 96), сверхэкспрессия (стр. 98). В литературный обзор включены устаревшие представления о необходимости димеризации классических кадгеринов для формирования адгезионных контактов и не отражена ключевая роль катенина p120 в регуляции эндоцитоза кадгеринов. К числу недостатков работы я бы отнесла не всегда хорошее качество иммуногистохимических препаратов опухолей. Хотелось бы также видеть количественную оценку содержания "Т-кадгерин +" и "Т-кадгерин -" сосудов в различных опухолях кожи. Есть вопросы к утверждениям о колокализации окрашивания двух маркеров в тех или иных структурах. Такую колокализацию хотелось бы видеть при большем увеличении при отдельной демонстрации изображений из красного и зеленого каналов конфокального микроскопа и их наложении.

Несмотря на отдельные незначительные недостатки, работа К.А. Рубиной является важным фундаментальным исследованием. Полученные данные убедительно доказывают точку зрения диссертантки о том, что Т-кадгерин является многофункциональной молекулой, регулирующей ангиогенез и барьерную функцию эндотелия, молекулой, которая участвует в развитии патологических процессов в сосудистой системе и вносит вклад в опухолевую прогрессию.

Диссертационная работа Рубиной Ксении Андреевны на тему «Т-кадгерин в процессах роста, ремоделирования кровеносных сосудов и опухолевой прогрессии» по специальности 03.03.04. – клеточная биология, цитология, гистология по актуальности, новизне, научному и методическому уровню теоретической и практической значимости, достоверности полученных результатов полностью соответствует п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, а диссертант заслуживает присуждения искомой степени доктора биологических наук по специальности 03.03.04 клеточная биология, цитология, гистология.

Зав. лабораторией механизмов канцерогенеза  
ФГБУ "РОНЦ им. Н.Н. Блохина"

Минздрава России,

доктор биологических наук

Н.А. Глушанкова

г. Москва 115478, Каширское шоссе, 24

natglu@hotmail.com 495-323-53-11

25 сентября 2015 г.

Подпись Н.А. Глушанковой заверяю:

Ученый секретарь

ФГБУ "РОНЦ им. Н.Н. Блохина"

Минздрава России,

кандидат биологических наук



И.Ю. Кубасова

## СВЕДЕНИЯ

### Официальный оппонент :

Глушанкова Наталия Александровна

Доктор биологических наук, специальность - 14.00.14 – онкология, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Российский онкологический научный центр имени Н.Н. Блохина», заведующая лабораторией механизмов канцерогенеза

Список публикаций за последние 5 лет по теме диссертации в рецензируемых научных изданиях

1. Д.В. Штанский, И.Ю. Житняк, И.А. Башкова, Ю.С. Погожев, А.Н. Шевейко, Н.А. Глушанкова. Влияние элементного состава и топографии поверхности на адгезию, пролиферацию и дифференцировку остеобластов. Биологические мембраны, 2010, 27 (4), 325-330.
2. И.Ю. Житняк, Н.А. Глушанкова Особенности морфологии, межклеточных взаимодействий и миграционной активности эпителиоцитов IAR-2, трансформированных онкогеном RAS: вклад белка межклеточной адгезии E-кадгерина. Онтогенез, 2011, 42(6), 453-464.
3. D.V. Shtansky, E.A. Levashov, I.V. Batenina, N.A. Gloushankova, N.Y. Anisimova, M.V. Kiselevsky, and I.V. Reshetov. Recent progress in the field of multicomponent bioactive nanostructured films, RCS Advances, 2013, 3, 11107-11115.
4. Н.А. Глушанкова, Д.В. Штанский. Дифференцировка остеобластов: роль адгезивных взаимодействий клеток. Биологические мембраны, 2013, 30(2), 136–141.
5. D.V. Shtansky, I.V. Batenina, Ph.V. Kiryukhantsev-Korneev, A.N. Sheveyko, K.A. Kuptsov, I.Y. Zhitnyak, N.Yu. Anisimova, N.A. Gloushankova. Ag- and Cu-doped multifunctional bioactive nanostructured TiCaPCON films. Applied Surface Science, 2013, 285, Part B, 331-343.
6. Глушанкова Н.А., Житняк И.Ю., Айолло Д.В., Рубцова С.Н. Роль E-кадгерина в неопластической эволюции эпителиальных клеток. Успехи молекулярной онкологии, 2014, 1, 12-17.
7. S.N. Rubtsova, I.Y. Zhitnyak, N.A. Gloushankova. A Novel Role of E-Cadherin-Based Adherens Junctions in Neoplastic Cell Dissemination. PLoS ONE, 2015, 10(7): 1-17, e0133578.
8. I.V. Sukhorukova, I.Y. Zhitnyak, A.M. Kovalskii, A.T. Matveev, O.I. Lebedev, X. Li, N.A. Gloushankova, D. Golberg, D.V. Shtansky. Boron nitride nanoparticles with petal-like surface as anticancer drug delivery system. ACS Appl Mater Interfaces, 2015, 7: 17217–17225.
9. I.V. Sukhorukova A.N. Sheveyko, Ph.V. Kiryukhantsev-Korneev, I.Y. Zhitnyak, N.A. Gloushankova, E.A. Denisenko, S.Yu. Filippovich, S.G. Ignatov, D.V. Shtansky. Toward bioactive yet antibacterial surfaces. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2015, 135: 158–165.

Эл.адрес, раб. Тел. natglu@hotmail.com, 499-323-53-11