

ОТЗЫВ

на диссертацию Салиховой Дианы Ирековны «Нейропротективные свойства нейрональных и глиальных клеток-предшественников, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Актуальность темы выполненной работы. Тема проведенного исследования безусловно актуальна, поскольку сосудистые заболевания центральной нервной системы являются чрезвычайно важной медико-социальной проблемой. В России заболеваемость и смертность от ишемического инсульта остаются одними из самых высоких в мире, а существующие методы терапии и реабилитации не позволяют в полной мере восстановить функциональную активность головного мозга. Это определяет необходимость разработки новых подходов к терапии острых нарушений мозгового кровообращения, в том числе с использованием методов регенеративной медицины.

Одним из наиболее перспективных и активно развивающихся инструментов регенеративной медицины являются технологии применения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК), которые могут быть получены путем репрограммирования зрелой соматической клетки с помощью трансдукции определенных генов. Направленная дифференцировка ИПСК позволяет получать любой тип клеток с целью создания персонализированных модельных клеточных линий для изучения безопасности и эффективности лекарственных препаратов. Кроме того, клеточные линии можно получать в неограниченном количестве и использовать при клеточной терапии, а также в качестве продуцентов видоспецифических белков и полипептидов, которые можно использовать для нейропротекторной терапии при комплексном лечении острых нарушений мозгового кровообращения.

Терапия на основе использования кондиционированных сред предлагает новый терапевтический подход, способный обойти ряд технических, клинических и этических ограничений прямой трансплантации стволовых клеток. В настоящее время большинство исследований изучают свойства кондиционированных сред, полученных из культур мезенхимальных стволовых клеток. Однако в современной отечественной и зарубежной научной литературе отсутствует информация о роли нейрональных и глиальных клеток-предшественников, полученных из ИПСК, и их секреторных продуктов в регенерации аксонов и дендритов, выживаемости нейрональных клеток, восстановлении функций головного мозга после моделирования ишемического инсульта.

Это обусловило цель исследования - сравнительное изучение нейропротективных и прорегенеративных свойств секретомов нейрональных и глиальных предшественников, полученных из ИПСК, на моделях экспериментального инсульта *in vivo*, глутаматной эксайтотоксичности и гипоксии *in vitro*.

Новизна исследования и полученных результатов, выводов, рекомендаций, сформулированных в диссертации

В данной работе достаточно подробно изучен состав белков, секретируемых данными типами культур, и выявлены их функциональные особенности с помощью анализа на основе литературных данных и базы UniProt. Также был исследован транскрипционный профиль ряда генов, который показал, что глиальные клетки-предшественники экспрессируют на достаточно высоком уровне гены *GREM1*, *GAS6*, *GDF15*, *LIF*, *TWF2*, *SNX3*, *MYDGF* и *TGFb2*, а нейрональные клетки-предшественники - *FGF8*, *NTN1*, *NPTX2*, *EFBN1*, *SERPIN1* и *VGF*. Продемонстрированы терапевтические и нейропротективные действия секретируемых белков нейрональными и глиальными клетками-предшественниками, полученными из ИПСК. Показано, что глиальные клетки-предшественники в большей степени, чем

нейрональные клетки-предшественники обладают паракринным действием, способствуя уменьшению количества апоптотических и некротических клеток в культуре мозжечковых нейронов при глутаматной эксайтотоксичности и нейробластомы линии SH-SY5Y при химической гипоксии. При этом автором установлено, что факторы, секретируемые глиальными клетками-предшественниками, обеспечивают рост аксонов и дендритов мозжечковым нейронам и клеткам нейробластомы линии SH-SY5Y, увеличивая экспрессию генов-маркеров нейритогенеза MAP2 и GAP43.

Автором продемонстрирован терапевтический эффект при системном введении кондиционированной среды глиальных клеток-предшественников животным с экспериментальным инсультом. Данная терапия уменьшала степень выраженности неврологического дефицита, при этом у животных в области ишемического повреждения наблюдалось уменьшение количества фагоцитирующих макрофагов/микроглии (CD68⁺-клеток) и увеличение количества новообразованных сосудов по сравнению с группой контроля. В то же время нейрональная кондиционированная среда не обладала подобными свойствами, за исключением способности к увеличению объемной плотности сосудов.

Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

В данной работе четко сформулированы цель и задачи исследования. Выбранные автором методы корректны для выполнения поставленных задач исследования и позволили определить тип культуры с нейропротективными и прорегенеративными свойствами. Результаты полученных исследований достоверны и не вызывают сомнений поскольку подкреплены достаточным объемом исследований и проанализированы с использованием корректной статистической обработкой. Степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов и рекомендаций не вызывает сомнений.

Значимость для науки и практики полученных автором результатов

Положения, сформулированные автором диссертационной работы, имеют как фундаментальное, так и прикладное значение. Результаты работы по изучению роли секретируемых веществ нейрональными и глиальными клетками-предшественниками в регуляции регенеративных процессов нервной ткани могут использоваться при обучении студентов, аспирантов, ординаторов биологических и медицинских вузов.

Секретом глиальных клеток-предшественников, который показал терапевтическую эффективность в модели экспериментального инсульта, может представлять собой перспективную основу препарата для терапии сосудистых заболеваний головного мозга.

Конкретные рекомендации по использованию результатов и выводов работы. Общая оценка диссертационной работы

Результаты диссертационной работы внедрены в лекционных курсах для аспирантов и ординаторов в ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова». В перспективе разработанный подход бесклеточной терапии на основе кондиционированных сред позволит создавать персонализированные препараты для регенерации нервной ткани.

Диссертационная работа имеет традиционную структуру и изложена грамотным научным языком. Работа состоит из 170 страниц машинописного текста и содержит 6 таблиц и 40 рисунков. Список цитируемой литературы включает 410 источников. Полученные результаты изложены подробно и логично и соответствуют выводам исследования. Автореферат полностью соответствует содержанию диссертации.

По теме диссертационной работы Салиховой Д.И. опубликовано 5 научных статей в журналах, входящих в перечень рецензируемых научных журналов и изданий ВАК. Получено два патента РФ на изобретения. Результаты проведенных исследований неоднократно были представлены на международных и российских конференциях.

По диссертации можно сделать следующие замечания:

1. Морфометрический анализ объемов повреждения головного мозга представлен в виде нормированных значений на объем очага инфаркта на первые сутки после моделирования ишемии. В таком варианте представления данных сложно оценить степень повреждения головного мозга и, соответственно, потенциальные возможности нейропротективной терапии. Диссертанту необходимо было дополнительно указать абсолютные значения объемов повреждения для каждой группы и временной точки.
2. В диссертации отсутствует указание, производилась ли поправка объема повреждения на первые сутки на степень отека поврежденного полушария по сравнению с контралатеральным?
3. При описании результатов гистологического исследования ткани головного мозга не указана изучаемая область. Следует отметить, что при моделировании ишемии головного мозга методом перекрытия средней мозговой артерии нитью образуется обширный ишемический очаг, который захватывает как кору, так и подкорковые структуры (стриатум), и в зависимости от зоны выраженность регенерации может различаться.

Однако в целом данные замечания относятся скорее к интерпретации экспериментальных данных, а не к их качеству, и никоим образом не умаляют высокой научной значимости и практической ценности полученных результатов и не влияют на общую положительную оценку диссертационной работы.

Заключение

Диссертационная работа Салиховой Д.И. «Нейропротективные свойства нейрональных и глиальных клеток-предшественников, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека», выполненная под руководством д.б.н., профессора Гольдштейна Д.В. и д.м.н., доцента Фатхудинова Т.Х., является научно-квалификационной работой, в

которой решена актуальная научная задача: исследована секреторная активность нейрональных и глиальных клеток-предшественников, полученных из ИПСК, и определена их роль в паракринной регуляции репаративных процессов нервной ткани. Результаты диссертационной работы имеют большое значение для клеточной биологии, цитологии, гистологии, неврологии и нейрофизиологии.

Работа Салиховой Д.И. соответствует требованиям п. 9 - 14 Постановление Правительства РФ «О порядке присуждения ученых степеней» от 24.09.2013 г. №842 в редакции от 28.08.2017 г. № 1024, 01.10.2018 г. № 1168, предъявляемым к диссертациям, представленным на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология. Актуальность, новизна, теоретическая и практическая значимость работы не вызывает сомнений, а сам автор заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология.

Старший научный сотрудник
лаборатории структуры и функции митохондрий
Научно-исследовательского института
физико-химической биологии имени А.Н.
Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова,
д.б.н.



Силачев Д.Н.
24.11.2020

Данные об оппоненте:

Силачев Денис Николаевич, доктор биологических наук по специальности 14.03.03 – патологическая физиология, старший научный сотрудник лаборатории структуры и функции митохондрий Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова 19992, Москва, Ленинские горы, дом 1, стр 40 proteins@mail.ru, тел.: +7 (495) 939-31-04

Подпись д.б.н. Силачева Д.Н. заверяю.



ПОДПИСЬ
УДОСТОВЕРЯЮ
ЗАВ. КАБ. ЦЕЛЯРИЕН
И. И. СЫДОРОВА

