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. Смертность от сосудистых заболеваний мозга в нашей стране занимает лидирующие позиции. Данное заболевание ведет к утрате нейронов в определенных областях мозга, вызывая неврологические нарушения, такие как частичный или полный паралич, дефекты речи или ее полная потеря, нарушения зрения, слуха, потеря памяти. В настоящее время нейрореабилитация таких пациентов является низкоэффективной. Одним из самых 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. Данная технология позволяет получать нейрональные и глиальные клетки и создавать на их основе персонализированные ноотропные лекарственные препараты для регенерации нервной ткани. Поэтому изучение нейропротективных свойств культур нейрональных и глиальных предшественников, полученных из ИПСК, является весьма актуальной медицинской задачей. Более того работы, посвященные изучению свойств данных типов культур, в литературе не представлены.

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

В данном исследовании впервые проведено сравнительное исследование состава секретируемых белков нейрональными и глиальными клетками-

предшественниками, полученными из ИПСК. Так, при проведении протеомного анализа были выявлены общие белки, содержащиеся в секретомах (кондиционированных средах) двух культур. При этом кондиционированная среда глиальных клеток-предшественников содержит 75 уникальных белков, а нейрональная – 136. Методом иммуноферментного анализа, было установлено, что концентрация нейротрофинов BDNF, GDNF, NGF и CNTF выше в глиальном секретоме. Таким образом, в данной работе впервые был выявлен широкий спектр секретируемых биологически активных веществ, не установленных для нейрональных и глиальных предшественников ранее. Также был исследован транскрипционный профиль ряда генов, который выявил различия в экспрессии генов. Так, 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, SERPINI1* и *VGF*.

Впервые определена роль секретируемых факторов нейрональными и глиальными клетками-предшественниками, полученными из ИПСК, в паракринной регуляции репаративных процессов нервной ткани. Было показано, что глиальные клетки-предшественники в большей степени обладают нейропротективным и прорегенеративным действиями, уменьшая количество апоптотических, некротических клеток и способствуя росту нейритов мозжечковых нейронов и нейробластомы линии SH-SY5Y в моделях химической гипоксии и глутаматной эксайтотоксичности *in vitro*.

Автором было показано, что системное введение кондиционированной среды глиальных клеток-предшественников, в отличие от нейрональных клеток-предшественников, усиливает восстановление функции головного мозга у животных после экспериментального инсульта, уменьшая степень выраженности неврологического дефицита, начиная с 14 суток эксперимента. У экспериментальных животных в тканях области повреждения достоверно менялся профиль экспрессии генов, отвечающих за воспаление: снижался уровень экспрессии гена провоспалительного цитокина *Tnfa* и увеличивалась

экспрессия генов противовоспалительных цитокинов (*Il4, Il10* и *Il13*). При этом у животных с введением глиальной кондиционированной среды количество фагоцитирующих макрофагов ($CD68^+$-клеток) в зоне некроза было ниже, чем в группе контроля. В то же время кондиционированные среды глиальных и нейрональных клеток-предшественников обладали ангиогенным действием, увеличивая количество и объемную плотность новообразованных сосудов, а также усиливали экспрессию гена *Vegf*.

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

В данной работе определена проблема, объект и предмет исследования, корректно сформулированы положения и выводы. Используемые автором методы соответствуют поставленным задачам исследования. Результаты проведенных исследований *in vitro* и *in vivo* с использованием биохимических, молекулярно-биологических, иммуноцитохимических и гистологических методов были корректно оценены с помощью современных методов компьютерной морфометрии и статистической обработки данных и позволили определить тип культуры с максимальными нейропротективными свойствами. При постановке исследования каждая экспериментальная группа состояла из достаточного количества образцов/животных и были выбраны адекватные группы контроля. С учетом вышеперечисленного полученные автором данные являются обоснованными и достоверными, а сформулированные выводы в диссертации адекватными.

Анализ литературы по изучаемой проблеме выполнен с достаточным количеством источников (410 российских и зарубежных источников) и состоит из глав, посвященных технологии получения и применения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК), дифференцировке ИПСК в нейрональном и глиальном направлении, патогенезу ишемического инсульта, моделям оценки нейротрофического и нейропротекторного действия биологически активных веществ *in vitro*,

экспериментальным моделям ишемического инсульта на животных. Автором тщательно проанализированы имеющиеся данные по исследуемой проблеме.

Значимость для науки и практики полученных автором результатов

Основные положения диссертационной работы посвященной изучению секретируемым веществам нейрональными и глиальными клетками-предшественниками и их воздействию на регенеративные процессы нервной ткани имеют как фундаментальное, так и прикладное значение. Полученные данные могут использоваться при обучении студентов, аспирантов, ординаторов биологических и медицинских вузов.

На основании результатов работы можно предположить, что секретом глиальных клеток-предшественников является перспективной основой персонализированного препарата для терапии сосудистых заболеваний головного мозга.

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

Работа изложена грамотным научным языком на 170 страницах машинописного текста и содержит 6 таблиц и 40 рисунков. Выводы диссертации сформулированы корректно и отражают все содержание работы. Достоверность данных подкреплено достаточным объемом исследований и адекватностью использованных моделей *in vitro* и *in vivo*. Результаты проделанной работы оценены с использованием корректной статистической обработкой. Автореферат изложен на 24 страницах и отражает основные положения диссертации.

Основные результаты диссертационной работы опубликовано в 14 научных работах, из них 5 статей в журналах, входящих в перечень рецензируемых научных журналов и изданий, рекомендованных ВАК Минобрнауки. Получено 2 патента на изобретения. Результаты проведенных исследований были доложены на международных, российских научных

конференциях. Принципиальных замечаний по представленной работе нет, но стоит обратить внимание на небольшие замечания:

1) При описании некоторых результатов отсутствует введение к необходимости каждого из последующих экспериментов, и переход от одних результатов к другим. Например, необходимость получения новых линий ИПСК неинтеграционным методом, а также в целом необходимость использования именно ИПСК, а не ЭСК (первый раздел результатов); переход к использованию мышиных моделей – раздел сразу начинается с сообщения о гибели крыс с образованием вазогенного отека.
2) При описании метода анализа экспрессии генов следует называть этот метод ОТ-ПЦР – ПЦР с обратной транскрипцией. Метод ПЦР в реальном времени лишь означает метод непосредственно анализа результата реакции. Принципиальным здесь является именно наличие этапа выделения РНК и обратной транскрипции.
3) Следует отметить, что на сегодняшний день, несмотря на перспективность применения ИПСК, они используются для in vitro исследований, и доклинических исследований, и лишь в нескольких случаях использовались в клинике, что пока не позволяет говорить, о том, что ИПСК можно использовать для персонализированной клеточной терапии (обзор литературы). В том числе и поэтому обоснован подход создания кондиционированных сред, а не использования самих клеток, в данной диссертации.

Несмотря на замечания, автором проделана очень сложная интересная работа и получены значимые результаты.

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 - изучено влияние секретируемых факторов нейрональными и глиальными клетками-предшественниками, полученными из ИПСК, на процессы регенерации нервной ткани. Результаты диссертационной работы имеют большое значение для клеточной биологии, цитологии и 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 № 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.

Научный сотрудник лаборатории
клеточных технологий
ФГБУ «НМИЦ эндокринологии»
Минздрава России
к.б.н., специальность 03.02.07 – генетика — Панова А.В.

23.11.2020

Данные об оппоненте:
Панова Александра Витальевна, кандидат биологических наук
по специальности 03.02.07 – генетика,
научный сотрудник лаборатории клеточных технологий
ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России
117036, г. Москва, ул. Дмитрия Ульянова, д. 11,
a.v.panova@mail.ru, тел.: +7 (499) 124-58-32

Подпись к.б.н. Пановой А.В. заверяю

Ученый секретарь
ФГБУ «НМИЦ эндокринологии»
Минздрава России, д.м.н. — Дзеранова Л.К.