

ОТЗЫВ

оппонента д.б.н., профессора Мухиной Ирины Васильевны на диссертационную работу Глазовой Маргариты Владимировны «Молекулярные механизмы регуляции пролиферации и дифференцировки нейрональных стволовых клеток и роль этих клеток в регенерации нервной ткани», представленной на соискание степени доктора биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия

Актуальность проведенного исследования. Диссертационная работа Глазовой М.В. посвящена актуальному вопросу биологии, в частности, нейрохимии – изучению молекулярных механизмов регуляции нейрогенеза в зрелом мозге. Нейрогенез у взрослых — это явление, относительно недавно признанное научным сообществом, которое опровергло существовавшую долгое время научную теорию о статичности нервной системы и её неспособности к регенерации. Существует гипотеза, что микроокружение в субвентрикулярной зоне и в зубчатой извилине гиппокампа (так называемая нейрогенная ниша) обладает специфическими факторами, которые необходимы для деления клеток предшественников нейронов, а также дифференцировки и интеграции новообразовавшихся нейронов. На современном этапе изучения механизмов нейрогенеза основные усилия направлены на определение и изучение факторов, которые регулируют пролиферацию, выживаемость, миграцию и дифференцировку нейрональных предшественников. Этими факторами являются гормоны, ростовые факторы, нейротрансмиттеры, цитокины, электрофизиологическая активность, стресс и др. Несмотря на повышенный интерес ученых к изучению нейрохимии нейрогенеза взрослого мозга, многие вопросы, особенно касающиеся регуляции нейрогенеза, остаются неизученными.

Например, нет ясного понимания роли белков внутриклеточных регуляторных каскадов в регуляции направленности развития клетки, и, особенно, механизмов, лежащих в основе наблюдаемых процессов стимуляции и торможения пролиферативной активности и дифференцировки клеток-предшественников во взрослом мозге.

Не ясной остается и роль трансплантированных клеток в мозг при проведении различных терапевтических процедур. Накопленные данные свидетельствуют о том, что при трансплантации прогениторные клетки разрушаются, выбрасывая в ткань мозга целый набор химических факторов, контролирующих восстановление нарушенных функций нейронных сетей в мозге. В связи с чем, требуется проведение комплексных работ, направленных на изучение биохимии регенеративных процессов во взрослом мозге с выявлением основных контролирующих факторов, которые бы могли стать мишенью терапевтических воздействий при лечении многих ишемических и дегенеративных заболеваний центральной нервной системы.

Все эти вопросы легли в основу цели научной работы диссертанта, которая была сформулирована следующим образом - изучить Bcl-2, p53 и Pim-1 зависимые механизмы нейрональной дифференцировки, а также механизмы регуляции регенерации нервной ткани после трансплантации стволовых клеток в зону повреждения. В качестве объективных методов, оценивающих механизмы регуляции регенерации нервной ткани, были выбраны адекватные биохимические, молекулярные и нейрофизиологические методы, отражающие роль сигнальных белков апоптоза, а также нейротрофина BDNF и цитокина IL6 в активации и ингибировании нейрональной дифференцировки. Перед автором были поставлены четкие задачи для решения выбранной цели, которые он и решил в ходе выполнения диссертационной работы.

Научная новизна исследования, теоретическая и практическая значимость полученных результатов, сформулированных в диссертации. Автором диссертационного исследования вынесены на защиту следующие основные положения: (1) сигнальные белки апоптоза p53, Bcl-2 и Pim-1 не только регулируют нейрогенез, но и осуществляют модулирующий контроль функционирования и дифференцировки катехоламинергических нейронов через ERK-зависимый сигнальный каскад и (2) трансплантированные пре-дифференцированные ЭСК секретируют в зону повреждения спинного мозга BDNF и IL-6, в результате чего в клетках реципиента происходит активация цАМФ/РКА стимулированная регенерации нервной ткани и быстрое восстановление сенсомоторных функций.

Для доказательства данных положений автором были получены следующие новые факты и разработаны гипотезы: (1) впервые были исследованы молекулярные механизмы регуляции нейрогенеза сигнальными белками апоптоза p53, Bcl-2 и Pim-1. Показано, что стимуляция нейрональной дифференцировки опосредована ингибирующим влиянием p53 на пролиферацию и активирующим действием на cRaf/ERK/CREB сигнальный каскад. При этом впервые показано, что p53 и Bcl-2 играют важную роль в регуляции дифференцировки катехоламинергических нейронов гиппокампа в процессе онтогенеза; (2) установлено, что Pim-1 играет модулирующую роль в регуляции направленности нейрональной дифференцировки и активирует синтез катехоламинов. При этом в зависимости от приходящих стимулов Pim-зависимая модуляция может быть опосредована различными белками, такими как NFATc, PKA, CRMP-2, ERK1/2 и p53; (2) на основании собственных данных и литературных *выдвинута гипотеза* об активном участии белков апоптоза как p53, Bcl-2 и Pim-1 в направленной регуляции нейрональной дифференцировки как *in vivo*, так и *in vitro*; (3) были получены данные о том, что эмбриональные стволовые клетки, дифференцированные по нейрональному типу, активно экспрессируют и секретируют BDNF и IL-6, что приводит к стимуляции регенерации

нервной ткани спинного мозга и быстрому восстановлению сенсомоторных функций.

Результаты исследования расширяют представления о биохимических механизмах нейрогенеза на всех уровнях: от пролиферации НСК до их финальной нейрональной дифференцировки.

Уточнены сведения о роли сигнальных белков апоптоза p53, Bcl-2 и Pim-1 и их непосредственном участии в регуляции внутриклеточной сигнализации, опосредующей развитие нейрогенеза. Внесены новые представления о том, что нейрональные стволовые клетки секретируют различные факторы роста и, таким образом, активируют механизмы регенерации нервной ткани. Хотя это утверждение автора чрезмерно обобщено, так как реально были исследованы только два фактора.

С практической точки зрения, полученные данные могут быть использованы для стимуляции направленной дифференцировки эмбриональных или нейрональных стволовых клеток в условиях *in vitro*, что может значительно повысить эффективность лечения стволовыми клетками.

Теоретические положения исследования могут быть использованы в курсах лекций для студентов биологических и медицинских факультетов ВУЗов.

Диссертация традиционно изложена на 266 страницах машинописного текста и состоит из 2 основных глав, введения, заключения, выводов и списка литературы, включающего 525 различных источников, иллюстрирована 7 таблицами и 77 рисунками.

Обзор литературы представлен на 63 страницах и включает основные положения, разработанные в литературе, о нейральных стволовых клетках, факторах и механизмах, регулирующих самообновление и дифференцировку НСК. Обзор написан грамотно, демонстрирует эрудицию автора в изучаемой проблеме, литературные данные представлены в логической цепочке, позволяющей сделать наиболее полное заключение о состоянии проблемы в науке по выбранному направлению. Замечанием является только то, что автор по некоторым разделам обзора в основном обсуждает результаты, полученные при изучении физиологической роли факторов и в меньшей степени особенности их биохимических механизмов регуляции.

Результаты и их обсуждение. Автором очень детально и логически представлены результаты исследования в 5-ти экспериментальных главах, которые имеют четкую структуру: небольшое введение в качестве предполагаемой гипотезы, которую автор доказывает или опровергает в последующих исследованиях, материалы и методы исследования, результаты и их обсуждение с заключением в виде схем регуляции внутриклеточных каскадов. Автором проведен статистический анализ полученных результатов с использованием различных методов оценки достоверности различий

В первой экспериментальной главе автор на животных: крысах Вистар (замечание – Вистар – это порода, а не линия), нокаутных мышах и мышах дикого типа, клеточных культурах РС12 и НСК мышей исследовала роль серинтреониновой киназы *Рim-1* в регуляции нейрональной дифференцировки. Автором проведен статистический анализ полученных результатов с использованием критерия Стьюдента для оценки достоверности различий. Замечание: не понятно, с помощью каких программ результаты исследования подвергнуты статистическому анализу, определялась ли нормальность распределения, не указано количество проб (*n*), в связи с чем сложно оценить достоверность результатов. В тексте и в таблицах результаты представлены в виде $M \pm m$ (SD). Остается не совсем понятно, как автор доказывал наличие незрелых и зрелых нейронов среди клеток линии РС12 по количеству и форме отростков. Не ясно, как получали нейральные стволовые клетки из гиппокампа мышей (нет протокола). Кроме того, автор употребляет название нейрональные клетки, что ставит в затруднение при чтении понимание, где стволовые клетки упоминаются, а где уже зрелые. В целом следует отметить, что получен огромный статистический материал, доказывающий, что *Рim-1* модулируют нейроэндокринные функции клеток РС12. Обсуждается механизм этой модуляции и делается предположение о наличии специфических свойств модулировать нейрональную дифференцировку нейронов, продуцирующих катехоламины. Выдвигается гипотеза о том, что модулирующие эффекты *Рim*-киназ могут быть опосредованы транскрипционным фактором NFATc1, PKA и MAPK киназами.

Во второй экспериментальной главе изучаются *Vcl-2*-зависимые механизмы нейрональной дифференцировки. В экспериментах были использованы мыши дикого типа и нокаутные по заинтересованному гену, крысы породы Вистар, органотипические культуры гиппокампа, переживающие срезы гипоталамуса, культуры НСК из новорожденных мышей. Замечание по статистике: также, как и в первой главе не понятно, как проводили анализ на нормальность распределения и сколько *n* в группе. Для ответа на вопрос о роли *Vcl-2* в нейрогенезе автором проанализированы катехоламинергические центры гипоталамуса половозрелых нокаутных по гену *Vcl-2* мышей. Было предположено, что что снижение числа ТН-позитивных клеток является результатом отсутствия экспрессии *Vcl-2* в критический период для формирования катехоламинергических центров гипоталамуса. Также автором подтверждено прямое влияние *Vcl-2* в регуляции активности катехоламинергических нейронов в экспериментах *in vivo*: внутригипоталамическое введение НА-14-1 привело к значительному снижению уровня ТГ в зоне инсерта и в аркуатном ядре. В экспериментах *in vitro* в случае органотипической культуры и в изолированных НСК автором выявлена стимуляция пролиферации в условиях ингибирования активности *Vcl-2*, что свидетельствует об анти-пролиферативной роли *Vcl-2*. Анализ внутриклеточных механизмов

свидетельствует о том, что основным посредником Vcl-2-индуцибельной дифференцировки является Raf/ERK/CREB сигнальный каскад

В третьей экспериментальной главе представлены результаты изучения p53-зависимых механизмов нейрональной дифференцировки клеток с доказательством гипотезы о стимулирующем действии p53 на нейрональную дифференцировку. Эксперименты были выполнены на мышах дикого типа и нокаутных по p53, крысах Вистар, органотипических культурах, переживающих срезах гипоталамуса, клеточных культурах PC12 и НСК мышей. Полученные данные напрямую свидетельствуют о том, что p53 регулирует активность ERK-зависимого каскада на уровне или выше Raf1, необходим для формирования и функционирования катехоламинергических клеток гипоталамуса, стимулирует дифференцировку клеток по нейрональному типу как в культуре клеток PC12, так и в культуре НСК. Автором доказано, что влияние p53 на ERK-зависимый MAPK каскад является универсальным, о чем свидетельствуют данные, полученные в результате анализа зрелых нейронов гипоталамуса.

В четвертой экспериментальной главе исследован нейрогенный потенциал спинного мозга на мышах линии CD1, органотипических культурах спинного мозга, культуре клеток линии D3. Было показано, что органотипическая культура спинного мозга может быть использована для производства нейросфер, клетки которых далее могут быть дифференцированы в нейроны различных типов. Кроме того, автором была выдвинута гипотеза, что клеточная гибель и/или длительное культивирование срезов спинного мозга могут перезапустить внутреннюю клеточную программу и стимулировать пролиферацию и дальнейшую дифференцировку НСК.

В пятой экспериментальной главе исследованы эффекты трансплантации НСК в зону поражения спинного мозга на предотвращение развития хронической боли, а с другой стороны, исследованы сигнальные пути, активируемые НСК в ткани реципиента. Полученные автором данные анализа поведения свидетельствуют о значительном позитивном эффекте трансплантации пре-дифференцированных по нейрональному типу ЭСК в восстановлении утраченных функций, вызванных локальным поражением части ткани спинного мозга. При этом анализ морфологической картины спинного мозга подтвердил наличие частичной регенерации ткани спинного мозга после трансплантации стволовых клеток. Автором выявлено, что трансплантация пре-дифференцированных ЭСК активирует BDNF и IL-6 сигнальные пути в ткани спинного мозга, приводя к активации цАМФ/РКА, изменению фосфорилирования cofilin и синапсина 1, что опосредует быстрый позитивный эффект и восстановление нервной ткани.

В целом в описании результатов прослеживается логика изложения, написано грамотно. Были выявлены многие закономерности и особенности взаимодействия белков, участвующих во внутрисклеточном сигналинге. Жаль, что не были использованы корреляционные методы в сравнительном анализе.

Автор, обсуждая результаты и делая выводы, предлагал гипотезы с использованием большого количества цитируемой литературы, что позволило ему выдвинуть ряд предположений, логически вытекающих из собственных данных и данных литературы.

Заключение. В конце диссертационной работы автор делает короткое заключение, позволяющее сжато представить обсужденные результаты.

Выводы. По результатам диссертационной работы автором было сделано 5 выводов. В целом выводы соответствуют поставленным задачам.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, личный вклад автора

Научные положения диссертационной работы обоснованы большим количеством и разнообразием экспериментальных моделей и методов исследования. Положения и выводы диссертационной работы сформулированы на основе полученных результатов и полностью отвечают поставленным задачам, а исследование соответствует паспорту специальности биохимия в области изучения теоретических и прикладных проблем природы и закономерностей химических превращений в живых организмах, молекулярных механизмов интеграции клеточного метаболизма, связей биохимических процессов с деятельностью органов и тканей, с жизнедеятельностью организма для решения задач сохранения здоровья человека, животных, выяснения причин различных болезней и изыскания путей их эффективного лечения.

Текст автореферата изложен в хорошем стиле, свидетельствует о высокой квалификации автора и соответствует содержанию диссертационной работы. Замечаний к содержанию автореферата, снижающих научную и практическую значимость работы, не выявлено. Основные результаты диссертации представлены в 34 печатных работах, в числе которых 15 статей в журналах, включенных в системы цитирования Web of Science и Scopus. Не вызывает сомнений личный вклад автора в планирование, выполнение исследований, обработку материала, анализ и написание статей.

В целом, сделанные замечания и заданные вопросы не умаляют значение диссертационной работы.

Заключение. Диссертационная работа Глазовой Маргариты Владимировны «Молекулярные механизмы регуляции пролиферации и дифференцировки нейрональных стволовых клеток и роль этих клеток в регенерации нервной ткани», является законченным научным исследованием, развивающим новое научное направление в области нейробиологии и нейробиологии, включающим выявленные новые принципиальные факты, гипотезы и закономерности развития нейрогенеза во взрослом мозге на биохимическом уровне.

Диссертационная работа Глазовой Маргариты Владимировны «Молекулярные механизмы регуляции пролиферации и дифференцировки нейрональных стволовых клеток и роль этих клеток в регенерации нервной ткани» соответствует требованиям п.9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением правительства РФ от 24 сентября 2013 г. за №842 (с изменениями в редакции постановлений Правительства РФ №335 от 21.04.2016, №748 от 02.08.2016), а ее автор заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия

Профессор кафедры нейротехнологий
Институты биологии и биомедицины
федерального государственного автономного
образовательного учреждения высшего
образования «Национальный исследовательский
Нижегородский государственный университет
им. Н.И. Лобачевского», 603022, Нижний Новгород,
пр. Гагарина, 23.

Доктор биологических наук, профессор

Мухина Ирина Васильевна

mukhinai@mail.ru



Подпись Мухиной И.В. заверяю

Ученый секретарь федерального государственного
автономного образовательного учреждения высшего
образования «Национальный исследовательский
Нижегородский государственный университет
им. Н.И. Лобачевского», к.соц.н. Черноморская Л.Ю.



Подпись Мухиной И.В. заверяю
Ученый секретарь федерального государственного
автономного образовательного учреждения высшего
образования «Национальный исследовательский
Нижегородский государственный университет
им. Н.И. Лобачевского», к.соц.н. Черноморская Л.Ю.



A handwritten signature in blue ink, appearing to be "И.В. Мухина", written over a horizontal line.