

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук, ведущего научного
сотрудника Степаничева Михаила Юрьевича на диссертацию на
соискание ученой степени
кандидата биологических наук Манжуло Ольги Сергеевны
на тему: «Нейро- и глиотропная активность докозагексаеновой кислоты при
моделировании компрессионной травмы спинного мозга у крыс»
по специальности 1.5.22 – «Клеточная биология»

Актуальность проблемы. Исследование межклеточных взаимодействий в ходе реализации нормальных жизненно-важных функций центральной нервной системы (ЦНС) и при развитии патологических процессов является одной из центральных задач клеточной биологии. В этой связи исследование клеточных механизмов развития посттравматического повреждения в головном и спинном мозге представляет особый интерес, поскольку модуляция межклеточных взаимодействий является вероятным подходом для разработки новых и совершенствования существующих методов их коррекции. Распространенность спинальной травмы различного генеза в мире крайне высока, что делает изучение как механизмов формирования и развития посттравматических изменений, так и поиск подходов к их лечению актуальными. И посттравматическое повреждение ткани спинного мозга, и процесс последующей регенерации протекают при активном участии клеток глии разных классов. Только в последние годы стало понятно, что клетки глии являются активными участниками этих событий, секретирова молекулярные медиаторы, регулирующие локальные воспалительные и реконструктивные процессы в поврежденных тканях спинного мозга. Использование фармакологических препаратов, оказывающих модулирующее влияние на межклеточные взаимодействия в очаге травмы, может существенно повысить эффективность предпринимаемых мер лечения и восстановления. Принимая во внимание

то, что в диссертации О.С. Манжуло предпринято исследование клеточных механизмов развития повреждения спинного мозга, вызванного травмой, и возможности коррекции патологии препаратом декозогексаеновой кислоты, можно сделать вывод о высокой актуальности представленной работы.

Структура диссертации и оценка её разделов. Структура диссертации традиционна. Диссертация содержит введение, обзор литературы, описание методов исследования, изложение результатов исследования и их обсуждение, заключение, выводы и список литературы. Работа изложена на 137 страницах и содержит 22 оригинальных рисунка и 2 таблицы. Список литературы включает 289 источников, из которых 6 на русском языке.

Во введении содержатся все необходимые разделы, позволяющие обосновать актуальность исследования, постановку цели и задач, описывающие новизну полученных результатов, теоретическое и практическое значение работы. Здесь же отражены методологические основы работы, сведения о степени достоверности полученных данных и личном вкладе автора. Некоторое недоумение вызвала констатация автором степени разработанности темы. Так, на с. 8 указывается, что механизмы патофизиологического процесса, развивающегося после спинальной травмы, являются предметом многочисленных исследований в ведущих научных центрах в России и за рубежом. При этом ни одной ссылки на работы отечественных авторов не приведено. В этой связи можно было хотя бы упомянуть работы, проводимые под руководством академика В.П. Чехонина.

Обзор данных литературы представлен на 22 стр. и содержит четыре раздела, посвященных анализу патологических процессов, протекающих в ткани мозга при травме, клеточных и молекулярных механизмов репарации спинного мозга, методов и подходов к терапии спинальной травмы и роли омега-3 жирных кислот в ЦНС в норме и при патологии. В первом разделе автор рассматривает структурные основы формирования

посттравматического рубца, процессы, протекающие в разных типах клеток и вовлеченность нейронов, микроглии и астроцитов в развитие посттравматического повреждения. Во втором разделе представлены современные представления о характере межклеточных взаимодействий на молекулярном уровне, анализирует временной характер молекулярных процессов, приводящих к развитию воспаления в травмированной ткани спинного мозга. В третьем разделе обзора литературы рассмотрены основные стратегии терапии травмы спинного мозга, базирующиеся на трансплантации клеток, электростимуляции, стимуляции эндогенных процессов репарации. На основании этого анализа автор приходит к выводу о том, что для успешного восстановления спинного мозга после повреждения необходимо использование комплексной стратегии, сфокусированной на нескольких мишенях. При этом комплексное восстановление должно включать мощную противовоспалительную терапию, предотвращение вторичного повреждения и стимулирование эндогенного регенераторного потенциала ЦНС. Заключительный раздел обзора посвящен анализу современных представлений о роли омега-3 жирных кислот в функционировании ЦНС и патологических процессах в ней. В этом разделе Манжуло О.С. подчеркивает важность этих соединений для нормальной работы клеток мозга, а также обсуждает существующие предпосылки для использования этих соединений в качестве терапевтического средства с комплексным эффектом.

Методическое обеспечение диссертационного исследования представляет собой сочетание классических и современных методов. Манжуло О.С. применила различные аналитические подходы, включая исследования на модели *in vivo* и *in vitro* на культуре клеток глии. В работе использованы традиционные гистологические методы и иммуногистохимические методы картирования экспрессии белков. Проведен биохимический анализ ферментативной активности и

иммуноферментативный анализ содержания белков. Соискатель использовала светлопольную микроскопию с количественным анализом размера повреждения и регенеративных процессов. Все использованные методы охарактеризованы автором в разделе «Материалы и методы». Следует отметить, что изложению методов часто не хватает подробности описания протоколов, которые должны позволить воспроизвести все использованные манипуляции. Например, не обоснован выбор дозы использованного препарата и протокол введения. В разделе 2.5 указано число изображений, которые использовали для анализа, но информация о том, сколько изображений получено для каждого животного не указано, так же как не расшифрована и дальнейшая обработка количественной информации. В связи с этим не ясно, какой массив данных был использован для последующего статистического анализа. Хотя полученные в экспериментах данные были обработаны статистически, но обращает на себя внимание, что в работе отсутствует информация об использовании статистических методов планирования экспериментов, подбора размера выборок, исходя из требуемой мощности критериев, а выбор методов анализа практически не описан. Информация о размерах выборок не представлена в этом разделе. Нет информации о том, как был организован массив данных для дисперсионного анализа и почему проводили однофакторный дисперсионный анализ; также, не указано был ли проведен анализ гомогенности дисперсий. Нигде не дано определение того, что такое независимый эксперимент, каков его объем.

Изложение результатов исследования является иллюстрацией ответов на те вопросы, которые автор сформулировала при постановке задач. Результаты представлены в виде 3 глав собственных исследований, очень разных по объему, которые в связи с этим возможно было объединить в одну большую главу. В первой главе, самой небольшой по размеру (2 стр.), автор представила результаты экспериментов по изучению восстановления

двигательной активности после спинальной травмы и влиянию докозогесаеновой кислоты (ДГК) на этот процесс. В этих экспериментах автор демонстрирует, что спонтанное восстановление движения после травмы происходит в очень незначительном объеме, а использованный препарат ДГК существенно улучшает состояние животных и ускоряет процесс восстановления. В последующих двух главах Манжуло О.С. постаралась представить данные, характеризующие механизмы, которые могут быть связаны с нарушением двигательных функций, и показывает, как ДГК может способствовать регенерации нервной ткани и купированию развития патологического процесса.

В главе 4 соискатель характеризует динамику процессов формирования очага повреждения и регенерации спинного мозга с использованием гистологических и иммуногистохимических методов с последующей количественной оценкой экспрессии соответствующих маркеров. В качестве таких маркеров были использованы основной белок миелина (ОБМ) и тирозингидроксилаза (ТГ). В работе продемонстрировано, что повреждение спинного мозга сопровождается образованием некротической области, окруженной плотной глио-мезодермальной капсулой. При этом применение ДГК обеспечивает образование более тонкого и рыхлого рубца, ограничивающего очаг повреждения, с высоким содержанием кровеносных сосудов и нервных волокон. Травма спинного мозга сопровождается процессом демиелинизации, особенно выраженным в очаге повреждения, тогда как введение ДГК, хотя и не способно было предотвратить полностью, но облегчало восстановление миелиновых оболочек в отдаленный период после травмы. Несколько вопросов возникли при анализе этого раздела. На рис. 4 можно было бы добавить фотографии срезов мозга ложнооперированных животных. На гистограммах, отражающих количественные данные, результаты исследования двух ложнооперированных групп представлены в виде одной линии. Вместе с

тем нигде не показаны данные этих групп по-отдельности, и не обосновано сведение данных из этих групп в одну общую группу. Это относится ко всем рисункам в работе, т.к. они построены по одному принципу. На рисунках отсутствует информация о размере выборки. Число срезов на группу в данном случае использовать не вполне корректно, поскольку при этом в анализ включаются переменные, полученные разными способами (связанные в случае срезов одного мозга и независимые, т.е. набор срезов, полученных от разных животных в группе). Также не очень понятно, почему автор относит процессы демиелинизации/ремиелинизации к нейротропным, учитывая, что источником миелина являются клетки глии.

Наконец, в последней главе результатов Манжуло О.С. представляет данные исследования реакции клеток глии на компрессионную травму спинного мозга и глиотропного влияния ДГК. Она показывает, что активация астроцитов при повреждении спинного мозга происходит в ростральном и каудальном сегментах на поздних сроках наблюдения. При этом течение посттравматического процесса сопровождается увеличением репаративной и пролиферативной активности в зонах, прилежащих к очагу повреждения. В определенной степени это может являться и отражением интенсификации воспалительного процесса, в первую очередь за счет реакции микроглии в острый посттравматический период, с постепенным его снижением на этапах реабилитации. Автору удалось показать, что введение ДГК увеличивает число элементов с маркером пролиферации/репарации PCNA в нервной ткани, вызывает более раннюю и выраженную астроцитарную реакцию и ведет к усилению экспрессии виментина во всех исследованных сегментах спинного мозга. Защитный эффект ДГК обеспечивался за счет модификации реакции микроглии/макрофагов в сторону преобладания M2-антивоспалительного типа клеток. В культуре клеток глии была продемонстрирована возможность увеличения антиоксидантной активности

супероксиддисмутазы. Было бы, наверное, интересно и, с точки зрения трансляционной ценности работы, важно, если бы автор показала, что аналогичные изменения антиоксидантной защиты наблюдаются и в условиях *in vivo*. Замечания к рисункам в этом разделе аналогичны приведенным выше. Кроме того, автору следовало бы более четко разделять понятия «экспрессия белка» и «активность фермента». Также представляется целесообразным не ограничивать исследования эффектов ДГК только антиоксидантной системой глии, поскольку в нейронах действуют те же защитные механизмы. Необходимо отметить, что при описании полученных результатов соискатель регулярно рассуждает об активности глиальных клеток, хотя напрямую активность никак не оценивалась. Было бы более корректным говорить в этих случаях об экспрессии маркеров активации или проявлении M1/M2 фенотипов. Тем не менее, полученные Манжуло О.С. результаты могут стать основой для дальнейшей верификации эффектов и эффективности препарата на базе ДГК с протекторным эффектом в отношении спинальной, а в перспективе и черепно-мозговой травмы.

Обсуждение результатов исследования и сопоставление их с существующими представлениями в этой области исследований проведено соискателем в каждой главе, посвященной изложению результатов. В небольшом по объему «Заключении» Манжуло О.С. подытожила результаты, подчеркнув уникальность эффектов исследованного вещества в отношении ряда аспектов патогенеза посттравматического повреждения спинного мозга, обращая внимание на способность ДГК оказывать как нейротропные, так и глиотропные эффекты.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, их достоверность и новизна. Диссертация на соискание ученой степени кандидата наук является научно-квалификационной работой, в которой содержится

решение задачи, имеющей значение для развития соответствующей отрасли знаний, в нашем случае клеточной биологии. Представленная диссертация направлена на исследование механизмов противовоспалительного и нейропротекторного действия докозагексаеновой кислоты при моделировании компрессионной травмы спинного мозга. Изучение специфических особенностей воспаления в ЦНС является одной из наиболее горячих тем в области нейробиологии, в широком смысле этого слова. Нейровоспаление определяют как стереотипную неспецифическую к иницирующему стимулу реакцию нервной ткани, для которой характерна активация тканевых макрофагов (микроглии), сопровождающаяся увеличением уровня провоспалительных цитокинов в ткани и активацией системы комплемента. С этой точки зрения поставленная О.С. Манжуло цель изучения механизма этой реакции на клеточном уровне и поиска путей разрешения воспаления безусловно относится к заявленной области науки. Для достижения этой цели соискатель поставила несколько конкретных задач, среди которых визуальное и инструментальное тестирование параметров двигательной активности и вегетативных функций у животных с моделью компрессионной травмы спинного мозга, характеристика морфологического состояния зоны посттравматического рубца и прилежащих к нему сегментов спинного мозга, оценка процесса демиелинизации и регенерации нервных волокон и динамики активности про- и противовоспалительной микроглии/макрофагов и посттравматического состояния астроглии. В своей работе Манжуло О.С. старалась обосновать нейротропные и глиотропные механизмы реализации противовоспалительного и нейропротекторного действия докозагексаеновой кислоты после повреждения спинного мозга.

Решение этих задач прежде всего позволило впервые дать комплексную характеристику нейро- и глиотропной активности ДГК, способствующей заметному улучшению двигательных функций у животных

с компрессионной травмой спинного мозга. Впервые установлено, что нейропротекторное действие ДГК реализуется за счет активации процессов ремиелинизации нервных волокон, пролиферации клеток, а также восстановления функционального состояния нервных волокон. При этом показано, что защитное действие ДГК обусловлено увеличением активности астроцитов с синхронным усилением экспрессии виментина, что приводит к ускорению васкуляризации посттравматического рубца, которая способствует восстановлению нервных волокон в области повреждения. В настоящем исследовании впервые дана обширная характеристика динамики активности общего пула и отдельных фенотипов микроглии/макрофагов на этапах острого и хронического воспаления при компрессионной травме спинного мозга. Показано, что ДГК ингибирует микроглию/макрофаги провоспалительного типа (M1) с одновременным увеличением активности противовоспалительного типа (M2) макрофагов.

Представленный в диссертации материал расширяет имеющиеся представления о роли глиальных клеток в механизмах развития травмы спинного мозга. Выявленные в работе особенности морфологии и активации астро- и микроглии спинного мозга в острый посттравматический период и на этапах восстановления формируют вектор для направленного поиска новых биологически активных соединений с комплексным влиянием на нервную ткань и могут служить теоретическим обоснованием использования нейропротекторного потенциала ДГК при терапии травмы спинного мозга.

Выводы и положения, выносимые на защиту в целом корректны, основаны на результатах проведенной работы. Можно было бы рекомендовать автору укрупнить положения, объединив положения 1 и 2. Это позволило бы связать структурные и функциональные эффекты ДГК. Достоверность полученных данных основана на проведении необходимого

числа экспериментов, а выявленные закономерности в основном подтверждены результатами статистического анализа.

Автореферат отражает содержание диссертации. В то же время в автореферате также встречаются неточности, характерные для текста диссертации. Например, название таблицы 2 «Количественная характеристика активности исследуемых иммуногистохимических маркеров». Не очень ясно, о какой активности маркеров ведет речь автор. Тем не менее, изложенный в автореферате материал позволяет составить полноценное представление о характере и объеме проведенной работы.

По материалам диссертации опубликовано 3 статьи в журналах, рекомендованных ВАК для публикации работ по этой специальности. Материалы работы представлены в виде докладов на 5 конференциях в России и за рубежом.

Следует отметить, что хотя работа в целом написана грамотно, в ней имеется довольно большое число опечаток и ошибок, которые было бы желательно исправить, есть замечания к стилю изложения и неточностям при описании методов, но, в целом, это не снижает качества проделанной автором работы. Большинство сделанных замечаний носят скорее рекомендательный или редакционный характер.

В заключение необходимо отметить, что диссертация на тему: «Нейро- и глиотропная активность докозагексаеновой кислоты при моделировании компрессионной травмы спинного мозга у крыс» соответствует основным квалификационным критериям (пп. 9–14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842), а ее автор Манжуло Ольга Сергеевна заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.22 – «Клеточная биология».

Официальный оппонент:

Степаничев Михаил Юрьевич

Доктор биологических наук

Ведущий научный сотрудник Лаборатории функциональной биохимии нервной системы,

ФГБУН Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН.

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация: 03.03.01 – «Физиология»

Адрес: 117485 г. Москва, ул. Бутлерова, д. 5а.

Тел. рабочий +7 495-952-40-07

Адрес электронной почты: m_stepanichev@ihna.ru

«10» сентября 2021 года



/М.Ю. Степаничев/



Подпись: Т. Степаничева М.Ю.
УДОСТОВЕРЯЮЩИЙ
канц. ИВНД и НФ
1 Кузнецкая ул.