

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора медицинских наук, доцента, профессора кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава России, Калиниченко Сергея Георгиевича, на диссертационную работу Жариковой Евы Игоревны на тему «Регенераторно-ассоциированные факторы при перsistентном и репаративном нейрогенезе в конечном мозге лососевых рыб», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук

1. Актуальность темы выполненной работы

Диссертационная работа Жариковой Евы Игоревны посвящена исследованию гоместатического и регенеративного нейрогенеза в конечном мозге молоди Тихоокеанских лососей. Исследование является актуальным, поскольку в диссертации методами иммуногисохимического маркирования было проведено изучение функциональной морфологии предшественников взрослого типа на модели лососевых рыб в зонах паллиума и субпаллиума, в результате чего были получены новые сведения об организации нейрогенных зон теленцефалона, содержащих нейральные стволовые клетки и предшественники различных типов. В настоящее время молекулярные особенности этих клеточных популяций в переднемозговом отделе различных группах позвоночных только начинают исследовать в условиях гомеостаза и репарации. В работе показано, как предшественники нейронов и/или нейральные стволовые клети ведут себя в условиях гомеостаза, и как изменяется их активность при острой травме.

Полученные в работе сведения с по-новому раскрывают гетерогенность нейрональных предшественников на примере молоди Тихоокеанских лососей. Таким образом, особенности развития конечного мозга молоди лососевых рыб, как эволюционно древних представителей позвоночных, является актуальным направлением исследований, поскольку до настоящего времени, биологические механизмы, связанные с высоким нейрорепаративным потенциалом молоди Тихоокеанских лососей остаются малопонятными.

2. Обоснованность научных положений выводов диссертации

Достаточный объем материала, представленный в диссертации, использование современной методологии и статистической обработки данных определяют обоснованность научных положений и выводов настоящей работы. Выводы диссертации

соответствуют поставленным задачам и определяются полученными результатами исследований. Материалы диссертации прошли многократную аппробацию на различных Российских и Международных научных форумах и в полной мере отражают содержание работы.

3. Значимость для науки результатов диссертационных исследований автора

В диссертационной работе впервые проведена верификация пролиферативных контуров эвертированного теленцефалона молоди Тихоокеанской симы и кеты. В ходе проведенного исследования автором выявлена нейроноспецифическая популяция Hu-CD-иммунопозитивных клеток, а также установлена высокая продукция даблкортиппозитивных нейробластов, образованных в постэмбриональный период развития лососевых рыб. Методами иммунопероксидазного маркирования выявлена популяция клеток, экспрессирующих виментин, GFAP и глутаминсинтетазу. Высказано предположение о том, что эти типы клеток являются предшественниками взрослого типа, поскольку они расположены в палиальных и субпалиальных областях теленцефалона с пролиферативной активностью. Полученные данные расширяют представления о постнатальном нейрогенезе при эвертированном типе развития теленцефалона позвоночных, с сохранением признаков эмбриональной структуры.

В диссертационном исследовании были получены новые сведения об особенностях конститутивного и посттравматического нейрогенеза у регенераторно-компетентных организмах – Тихоокеанских симы и кеты, сохраняющих признаки фетализации в ходе онтогенеза. Впервые получены новые результаты, связанные с особенностями биологии H₂S-продуцирующих систем мозга лососевых рыб. В частности, установлено увеличение количества клеток, производящих сероводород после травмы, коррелирующее с наростанием числа глутамин-синтетаза-продуцирующих клеток, что, по мнению автора, приводит к снижению экзайтотоксических эффектов глутамата и снижению нейровоспалительных процессов. Автором высказано предположение, что в условиях конститутивного нейрогенеза, H₂S может выступать в качестве фактора, способствующего дифференцировке нейронов и созревания нейронных сетей в теленцефалоне лососей, являясь регулятором нейрональной пластичности мозга в постэмбриональный период. В посттравматический период Е.И. Жариковой показано значительное увеличение числа CBS-продуцирующих клеток в зонах пролиферации, что приводит к увеличению синтеза H₂S, способствующее поддержанию цереброваскулярного гомеостаза, подразумевающего антиапоптотическое, противовоспалительное и антиоксидантное влияния, снижающие

вторичное повреждение нейронов, возникающее в результате окислительного стресса.

Данные исследований о распределении Pax2-экспрессирующих клеток в теленцефалоне молоди кеты в ходе посттравматического периода позволили Е.И. Жариковой предположить их функциональную активность при регуляции генной экспрессии в ходе постэмбрионального онтогенеза и при острой травме. Полученные данные о пролиферирующих нейрональных и ненейрональных популяциях в палиуме и субпаллиуме эверированного мозга лососей способствуют пониманию механизмов взрослого и посттравматического нейрогенеза.

4. Достоверность результатов, полученных в ходе исследовательской работы

Жариковой Е.И. получены достоверные научные результаты, которые опубликованы в ведущих научных журналах, рекомендованных ВАК Российской Федерации. В частности, список публикаций содержит журналы «Белого списка ВАК» (журналы Онтогенез, Журнал эволюционной физиологии и биохимии, Морфология), а также международные издания - International Journal of Molecular Science, (Q1), и Brain Science, (Q2). Все публикации в полной мере отражают содержание работы и соответствуют цели - исследование популяций клеток, участвующих в конститутивном и посттравматическом нейрогенезе конечного мозга молоди лососевых рыб в ходе постнатального онтогенеза.

В диссертационной работе приведенные результаты многочисленных исследований на молоди Тихоокеанской симы и кеты были выполнены с помощью современных иммуногистохимических методов исследований с использованием широкой панели специфических антител. В диссертации методологическая часть не вызывает сомнений. Для всех экспериментальных вариантов иммуногистохимического анализа, связанных с острым травматическим повреждением мозга, автором приведены гистологические контроли. Они показывают исходный уровень экспрессии различных молекулярных маркеров в теленцефалоне молоди лососей. В диссертации использованы различные антитела, выявляющие пролиферацию (PCNA), а также позволяющие экспериментально верифицировать пролиферирующие клетки в посттравматическом периоде (BrdU). Для выявления популяций вновь образованных нейронов соискателем был использован даблкортин, а более зрелых дифференцированных форм нейронов – протеин HuCD. Для выявления предшественников взрослого типа автором были использованы маркеры глиальной специализации: GFAP, GS и виментин. Для верификации H₂S-продуцирующих клеток, использовали фермент синтеза CBS. В диссертации проанализирован достаточный

объем материала, данные суммированы в нескольких таблицах, и проведена адекватная статистическая обработка полученных результатов, что вызывает доверие к результатам диссертационного исследования. В тексте работы не содержатся заимствованные данные без ссылок на источники. В целом, методологическая часть работы отвечает современному уровню решения проблем и свидетельствует о правильности приведенных автором доказательств, полученных в ходе исследовательской работы.

5. Содержание диссертационного исследования

Содержание диссертации Жариковой Е.И. имеет классическую структуру и включает разделы Введение, Обзор литературы, Материалы и методы исследования, Результаты, Обсуждение, Заключение и Выводы, а также Список литературы, содержащий 228 источников, из которых 9 на русском и 219 на английском языках. Работа иллюстрирована 30 фотомонтажами и 16 таблицами и включает 210 страниц машинописного текста.

В вводной части автор указывает актуальность исследования и степень ее обоснованности, а также формулирует цель и задачи диссертационного исследования. В данном разделе Жарикова Е.И. также обосновала Научную новизну, а также теоретическую и практическую значимости работы.

В разделе «Обзор литературы» автором приводится современный анализ данных из литературных источников, позволяющих определить проблему нейрогенеза в мозге взрослых позвоночных, а также ее связь с вопросами нейрональной пластичности и нейрональной регенерации среди рыб, как эффективных современных моделей для исследования нейрогенеза. Автор проанализировала большой объем литературы по проблемам нейрогенеза, данная глава написана хорошим научным языком, что указывает на глубокое и разностороннее понимание автором современных направлений исследования нейрогенеза.

Раздел Методология и методы диссертационного исследования включает описание дизайна экспериментальных исследований нейротравм, проводимых на молоди Тихоокеанской симы и кеты. Автор в данном разделе обосновывает применение широкой панели антител для исследования нейрогенеза и нейрональной регенерации в мозге молоди лососевых рыб.

В разделе «Результаты исследований» автор подробно и по единой методической схеме рассматривает локализацию различных имmunогистохимических маркеров, участвующих в пролиферации (PCNA, BrdU), нейрональной дифференциации (HuCD), глиогенезе (GFAP, GS, Vim), формировании новых нейронов во взрослом мозге

(даблкортин), неканонических нейромедиаторов (CBS), а также транскрипционных факторов (Pax2) в паллиальной и субпаллиальной областях интактных животных, а также в различные периоды после острого травматического повреждения.

В разделе «Обсуждение» Е.И. Жарикова, анализируя различные источники, обсуждает полученный на молоди лососевых рыб материал. Одним из достоинств данного раздела является попытка сравнительного анализа данных о нейрогенезе конечного мозга лососевых рыб с данными на млекопитающих, а также других моделях рыб, в частности данио рерио. Автор, несомненно, справилась с поставленными задачами, а представленная работа содержит много интересных и новых результатов и выполнена на высоком методическом уровне.

Раздел «Выводы» отражает полученные результаты работы и соответствует поставленным задачам исследования.

6. Важность результатов проведенных исследований для научной среды, возможность применения на практике

Нервные стволовые клетки и клетки-предшественники (НСКП) являются основным источником новых нейронов в головном мозге человека и животных, играя ключевую роль в гомеостазе и пластичности ЦНС на протяжении всей жизни. В головном мозге позвоночных НСКП расположены в различных нейрогенных нишах, отличающихся своим расположением, клеточным составом и пролиферативным поведением. Предполагается, что гетерогенность популяции НСКП отражает различную способность к нейрогенезу, пластичности и восстановлению между различными нейрогенными зонами. С момента открытия нейрогенеза у взрослых людей исследования были в основном сосредоточены на поведении и биологическом значении взрослых НСКП (вНСКП) у грызунов. Однако, по сравнению с грызунами, которые на протяжении всей жизни демонстрируют нейрогенез только в двух ограниченных нейрогенных нишах переднего мозга, у рыб конститутивный нейрогенез выявлен в нескольких нишах стволовых клеток, которые обеспечивают новыми нейронами каждый основной отдел мозга. Соответственно, рыбы, в частности, Тихоокеанские лососи являются интересной моделью для исследования уникальных клеточных и молекулярных профилей НСКП и изучения того, как эти профили управляют гомеостазом тканей и регенеративной пластичностью в различных популяциях стволовых клеток с течением времени. Исследование вопросов о том, в какой степени различные популяции НСКП функционируют и созревают в процессе развития молоди лососей, реагируют на опыт и способствуют успешной регенерации ЦНС у Тихоокеанских

лососей, представляет важную и актуальную научную задачу с потенциалом практического применения в клеточной и регенеративной биологии.

7. Согласованность автореферата и текста диссертации

Автореферат достаточно полно излагает формулировку проблемы и основные результаты исследования и находится в полном соответствии с текстом диссертации и не содержит заимствований без ссылок на источники.

В рамках научной дискуссии хотелось бы обсудить следующие вопросы:

1. Как изменяется уровень эндогенной глутаминсинтетазы в глиальных клетках конечного мозга молоди лососевых рыб в условиях интактности и после травмы? При черепномозговой травме в мозге млекопитающих наблюдается лишь кратковременное увеличение уровня глутаминсинтетазы в зоне повреждения, а в долговременной перспективе характерно снижение её концентрации в клетках астログлии. Это ведет к развитию нейровоспаления и в дальнейшем к формированию глиального рубца. Поскольку локализация глутаминсинтетазы не всегда соотносится с положением глутаматергических центров, требует уточнения функциональное назначение фермента в мозге симы.
2. Почему возникает снижение числа Pax2-экспрессирующих клеток в различных регионах конечного мозга у молоди кеты? Почему большинство исследованных в работе факторов при травме конечного мозга проявляют тенденцию к увеличению числа имmunопозитивных клеток, а экспрессия транскрипционного фактора Pax2, напротив, снижается?
3. Вызывает интерес обнаружение паттернов радиальной и тангенциальной миграции иммунореактивных клеток. Как это соотносится с типологией маркированных нейронов?

Заключение

Диссертация Жариковой Евы Игоревны «Регенераторно-ассоциированные факторы при перsistентном и репаративном нейрогенезе в конечном мозге лососевых рыб», представленная к защите на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.22. Клеточная биология, является законченной научно-квалификационной работой, в которой установлены пространственные и морфофункциональные отношения клеток, экспрессирующие различные регенераторные и морфогенетические факторы в условиях конститутивного гомеостаза и при остром

травматическом повреждении.

Диссертационная работа Жариковой Е.И. соответствует критериям, предъявляемым ВАК Российской Федерации к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук согласно п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», установленного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 (в редакции от 25.01.2024 г.), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор достоин присуждения искомой степени по специальности 1.5.22. Клеточная биология (биологические науки).

Официальный оппонент:

Профессор кафедры гистологии,

эмбриологии и цитологии

ФГБОУ ВО ТГМУ

Минздрава России

д-р мед. наук, доцент



С.Г. Калиниченко

10 сентября 2024 г.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации; адрес организации: 690002, г. Владивосток, пр. Островского, д. 2. Тел.: +7(423) 2450706, факс: +7(423) 2451719, e-mail: mail@tgmu.ru; e-mail оппонента: sgkalinichenko@gmail.com; телефон оппонента: 8(423)2454378

Подпись официального оппонента Калиниченко С.Г. заверяю

ученый секретарь ученого совета

ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава Росс

д-р мед. наук, профессор



Е.В. Просекова

