

ОТЗЫВ

официального оппонента, кандидата биологических наук,
Логашенко Евгении Борисовны,
на диссертацию Ращупкина Ивана Михайловича

**«Нейрорегуляторные и противовоспалительные эффекты секреторных продуктов
M2 макрофагов *in vitro* и *in vivo*»**, представленную на соискание учёной степени
кандидата медицинских наук

по специальности: 3.2.7. Иммунология.

Актуальность темы диссертационной работы

Известно, что в условиях воспаления моноциты периферической крови способны проникать в ткани головного мозга и дифференцироваться там в макрофаги. Макрофаги представляют собой гетерогенную популяцию клеток, отличающихся высокой адаптивностью и пластичностью – их функциональные характеристики и свойства могут существенно меняться в зависимости от сигналов окружающей среды. Провоспалительно активированные макрофаги преимущественно проявляют деструктивное действие на ткани, тогда как противовоспалительные способствуют репаративным процессам. Макрофаги, наряду с микроглией, играют ключевую роль в регуляции и опосредовании нейрорегенераторных процессов. Однако нейрорегенераторный потенциал различно активированных макрофагов остаётся малоизученным. Так, большинство исследователей концентрируют своё внимание на изучении M1 и M2a клеток, в то время как разнообразие фенотипов макрофагов значительно шире. В частности, влияние взаимодействия макрофагов с апоптотическими клетками (эффероцитоз) как одного из важных индукторов M2 фенотипа, в приобретении и реализации нейрорегуляторной активности макрофагами, практически не исследовано.

Настоящая диссертационная работа посвящена как изучению влияния секреторных продуктов различно активированных макрофагов на свойства нейральных предшественников *in vitro*, так и исследованию *in vivo* эффектов интраназального введения секреторных продуктов макрофагов, активированных посредством эффероцитоза, в модели стресс-индуцированной депрессии у мышей. Наряду с характеристикой нейрорегуляторных свойств макрофагов с различным фенотипом, в том числе поляризованных эффероцитозом, тема настоящего исследования, безусловно, представляется значимой в контексте неуклонного роста распространённости тревожно-депрессивных расстройств, патогенез которых связан с нейровоспалением и нарушением нейрогенеза. Таким образом, тема диссертационной работы Ращупкина И.М. является актуальной как с точки зрения фундаментальной науки, так и в практическом отношении.

Степень обоснованности и достоверности научных положений и выводов

Научная достоверность результатов, представленных в диссертационной работе, обеспечивается комплексным подходом к проведению исследования. Дизайн исследования тщательно продуман, логически выстроен и соответствует поставленным целям и задачам. Для обработки данных применялись адекватные статистические методы. Основные результаты работы доложены и обсуждены на научных конференциях, а также представлены в 7 печатных работах, 4 из которых опубликованы в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ.

Выводы исследования логически вытекают из полученных результатов и подтверждаются экспериментальными данными. Положения, выносимые на защиту, полностью соответствуют достигнутым научным результатам, что подчеркивает их обоснованность. Таким образом, работа удовлетворяет всем критериям достоверности и может служить основой для дальнейших исследований в данной области.

Научная новизна исследования, практическая и теоретическая значимость

Диссертационная работа Ращупкина И.М. содержит два больших блока – исследования *in vitro*, выполненные на клеточной линии SH-SY5Y, и *in vivo* на модели стресс-индуцированной депрессии у мышей. Автором впервые исследовано влияние секреторных факторов макрофагов человека, полученных путем GM-CSF дифференциации моноцитов периферической крови, и поляризованных различными способами – интерфероном γ [M1], интерлейкином 4 [M2a] и взаимодействием с апоптотическими клетками [M2(LS)], на свойства нейральных предшественников линии SH-SY5Y в условиях повреждающих воздействий, а именно депривации сыворотки и химически-индуцированной гипоксии.

В ходе работы было показано, что секреторные продукты макрофагов всех исследованных фенотипов стимулируют пролиферацию и дифференцировку нейральных предшественников, причём M2(LS) обладают наиболее выраженным эффектом в условиях длительного комбинированного повреждающего воздействия. Продemonстрирована способность M2(LS) макрофагов поддерживать жизнеспособность клеток SH-SY5Y при сочетанном действии депривации сыворотки и гипоксии. Продemonстрировано, что секреторные продукты макрофагов всех исследованных фенотипов оказывают стимулирующее воздействие на пролиферацию и дифференцировку нейральных предшественников в условиях депривации и депривации/гипоксии *in vitro*. В то же время в условиях длительного комбинированного повреждающего воздействия пропролиферативные и продифференцировочные эффекты M2(LS) макрофагов превышают эффекты M2a и M1. Более того, только M2(LS) макрофаги продемонстрировали нейропротективную активность, т.е. способность поддерживать жизнеспособность клеток SH-SY5Y при сочетанном действии депривации сыворотки и гипоксии. Основываясь на

полученных результатах, автор идентифицирует M2(LS) макрофаги как клетки с наиболее выраженными нейрорегенеративными свойствами и в следующей части своей работы исследует эффекты секреторных продуктов M2(LS) макрофагов у мышей с депрессивно-подобным поведением.

На модели стресс-индуцированной депрессии *in vivo* впервые исследовано влияние интраназального введения секреторного продукта M2(LS) макрофагов. Автором показано, что курсовое введение M2(LS) секретомы сопровождается коррекцией поведенческого паттерна депрессивноподобных мышей, при этом наблюдается снижение уровня провоспалительных цитокинов и экспрессии маркера активации микроглии Iba-1 в патогенетически значимых зонах мозга и повышение нейрональной плотности во фронтальной коре и гиппокампе. В целом, полученные данные свидетельствуют о выраженной противовоспалительной и нейрорегуляторной активности макрофагов человека с M2 фенотипом, сформированным в результате эффероцитоза. Теоретическая ценность работы заключается в углублении понимания нейрорегуляторных свойств макрофагов различных фенотипов, в частности, активированных посредством эффероцитоза, демонстрирующих максимальную эффективность как *in vitro*, так и *in vivo*. Практическая значимость исследования связана с перспективой использования секреторных продуктов макрофагов с выраженными нейрорегенеративными свойствами для разработки новых подходов к терапии нейродегенеративных и нейровоспалительных заболеваний.

Оценка содержания диссертационной работы и её завершённость

Диссертационная работа Ращупкина И.М. построена по традиционной схеме и включает следующие разделы: введение, обзор литературы (глава 1), материалы и методы (глава 2), результаты (глава 3), обсуждение (глава 4), заключение, выводы и библиографический список из 272 источников. Объем работы составляет 142 страницы машинописного текста, содержит 18 иллюстраций и 5 таблиц.

Во Введении автор формулирует цели и задачи своей работы, обосновывает актуальность исследования, оценивает научную новизну и потенциальную практическую значимость результатов, формулирует положения, выносимые на защиту. Поставленные 5 исследовательских задач полностью соответствуют данной цели.

Глава 1, содержащая обзор литературы, посвящена систематизации современных представлений об изучаемой проблеме. Охарактеризованы различные фенотипы макрофагов и данные об их участии в процессах регенерации. Особое внимание уделено изложению известных сведений об участии микроглии и макрофагов в обеспечении процессов функционирования ЦНС как в физиологических, так и в патологических условиях. Подробно охарактеризованы составляющие процесса нейрорегенерации и

возможные методы её исследования *in vitro* и *in vivo*. Рассмотрены различные гипотезы формирования депрессивного расстройства. Отдельные разделы литературного обзора посвящены анализу роли макрофагов и микроглии в патогенезе нейродегенеративных и нейровоспалительных заболеваний, а также возможных иммунотерапевтических подходов на основе использования макрофагов и других иммунокомпетентных клеток для терапии патологии ЦНС.

Глава 2, содержащая описание материалов и методов исследования, подробно описывает схемы проводимых *in vitro* и *in vivo* экспериментов, иллюстрируя их рисунками. Охарактеризованы условия культивирования клеток SH-SY5Y, включающие повреждающие воздействия: депривацию сыворотки и химически-индуцированную гипоксию. Весьма подробно описана применяемая в работе модель стресс-индуцированной депрессии у мышей. Указаны методы статистики, соответствующие дизайну исследования. Все методики, использованные в исследовании, детально прописаны и пояснены, что предоставляет возможность воспроизведения экспериментов по приведенным протоколам.

Глава 3 описывает результаты проведенного исследования. Данная глава логически выстроена в соответствии с задачами диссертационной работы и содержит 5 разделов. В разделах 1-3 описаны результаты витрального блока работы, а именно данные о влиянии секреторных продуктов, полученных от различно активированных макрофагов (поляризованных IFN γ [M1], IL-4 [M2a] и взаимодействием с апоптотическими клетками [M2(LS)]) на свойства нейральных предшественников линии SH-SY5Y в условиях повреждающих воздействий – депривации сыворотки и гипоксии. Охарактеризованы эффекты секреторных продуктов макрофагов на пролиферацию, выживаемость, клеточный выход и дифференцировку клеток SH-SY5Y. В разделах 4-5 описаны результаты исследований *in vitro*, а именно данные о влиянии курсового интраназального введения секреторного продукта M2(LS) в модели стресс-индуцированной депрессии у мышей. Охарактеризованы эффекты M2(LS) на поведенческий паттерн мышей, параметры воспалительной реакции (уровень провоспалительных цитокинов и экспрессия маркера активации микроглии Iba-1) и нейрональную плотность в различных зонах головного мозга.

Глава 4 содержит анализ данных, полученных автором, а также их сопоставление с таковыми, описанными в литературе. В данной осмыслению полученных результатов в контексте современных научных представлений, критическому их анализу и оценке.

Заключение представляет собой краткое изложение основных данных, полученных в работе. Представлено 6 выводов, логично вытекающих из поставленных целей и полученных результатов.

В работе можно отметить некоторое количество замечаний:

Так, в разделе Обзор литературы приведен всего 1 рисунок и ни одной таблицы, что несколько затрудняет восприятие материала.

В разделе Результаты исследования, приведены рисунки (13С и 17), которые не упоминаются и не обсуждаются в тексте. Также на некоторых графиках (Рисунок 14 и 15) отсутствуют подписи осей координат.

Также отмечается некоторая небрежность в подаче иллюстративного материала. Рисунки и графики сделаны в различном формате и размере.

Тем не менее, сделанные замечания не снижают научной ценности полученных результатов и сделанных выводов и ни в коей мере не умаляют хорошего впечатления от работы.

При прочтении работы возникли следующие вопросы:

- 1) При изучении влияния кондиционной среды (КС), полученной от M2(LS) макрофагов, на пролиферативную активность клеток SH-SY5Y автором было показано, что стимулирующий эффект проявлялся уже в присутствии 10% КС M2(LS), а увеличение концентрации КС до 30% приводило к более выраженной стимуляции пролиферативной активности SH-SY5Y в сравнении с 10% КС, при этом дальнейшее повышение концентрации КС до 50% не приводило к усилению стимулирующего эффекта. Чем можно объяснить такое наблюдение?
- 2) Автор показывает, что в проведенном эксперименте ни депривация сыворотки, ни гипоксия не являлись стимуляторами дифференцировки клеток SH-SY5Y. Однако при этом упоминает, что многие протоколы дифференцировки клеток SH-SY5Y, помимо добавления собственно индуктора дифференцировки (например, ретиноевой кислоты), все-таки предполагают также снижение концентрации сыворотки в культуральной среде. Чем можно объяснить такое противоречие эффектов?
- 3) Почему при проведении *in vivo* экспериментов на мышинной модели использовали макрофаги человека, а не мыши? Не могли ли наблюдаемые эффекты быть связаны с наличием и ответом на чужеродный антиген?
- 4) Почему в эксперименте по определению влияния растворимых факторов макрофагов на поведенческий паттерн и нейрональную плотность в головном мозге депрессивноподобных мышей не использовалась ретиноевая кислота в качестве положительного контроля дифференцировки нейральных предшественников?
- 5) При изучении влияния растворимых факторов M2(LS) макрофагов человека на выраженность воспаления в головном мозге депрессивноподобных мышей был измерен уровень провоспалительных цитокинов в лизатах отдельных структур головного мозга

(гиппокамп, стриатум и фронтальная кора). На основании чего были выбраны именно эти отделы и чем можно объяснить различный ответ на введение растворимых факторов M2(LS) макрофагов в этих структурах?

Заключение

Диссертационная работа Ращупкина Ивана Михайловича «Нейрорегуляторные и противовоспалительные эффекты секреторных продуктов M2 макрофагов *in vitro* и *in vivo*», представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности: 3.2.7. Иммунология, является самостоятельной завершённой научно-квалификационной работой, выполненной на высоком методическом уровне и посвященной решению актуальной для современной иммунологии научной задачи – характеристике регуляторных эффектов секреторных продуктов M2 макрофагов *in vitro* и *in vivo*.

Таким образом, по своей актуальности, научной новизне, теоретической и научно-практической значимости полученных результатов, диссертационная работа полностью соответствует требованиям ВАК РФ, предъявляемым к кандидатским диссертациям (п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842, с изменениями от 16.10.2024 г., № 1382), а её автор Ращупкин И.М. заслуживает присуждения искомой степени кандидата медицинских наук по специальности: 3.2.7. Иммунология.

Официальный оппонент:

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биохимии нуклеиновых кислот, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской Академии Наук (ИХБФМ СО РАН), г. Новосибирск

Логашенко Евгения Борисовна

16. 05. 2025

Адрес организации: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук.

Адрес: 630090, Россия, г. Новосибирск, проспект Лаврентьева 8.
www.niboch.nsc.ru, e-mail: evg_log@niboch.nsc.ru, +7(913)-911-3243

Подпись к.б.н. Е.Б.Логашенко заверяю:



П.Е. Пестряков

И.П.

Зам. директора по научной работе ИХБФМ СО РАН,