

ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию Тюрина-Кузьмина Петра Алексеевича
на тему: «Адренергическая регуляция постнатальных мультипотентных
мезенхимных стромальных клеток человека: сенситизация рецепторов,
активация стволовых клеток и управление их дифференцировкой»
на соискание ученой степени доктора биологических наук по
специальности 1.5.5 – «Физиология человека и животных»

Диссертационная работа П.А. Тюрина-Кузьмина выполнена по специальности физиология человека и животных. Многие годы основные усилия физиологов были направлены на изучение быстрых реакций отдельных клеток и всего организма на внешние и внутренние стимулы (раздражители). В настоящее время физиологическая наука подошла к черте, когда стало возможным выяснение молекулярных и клеточных механизмов долговременных процессов в организме, по длительности сопоставимых с периодом жизни человека. Данное направление связано с изучением стволовых клеток. В начале 21 века стало понятным, что в основе онтогенетического развития лежит постоянное обновление тканей и органов, происходящее в результате скоординированного деления стволовых клеток. Регуляция этих процессов и управление ими становятся одними из главных вопросов современной биологии и медицины. Проведенное в диссертационной работе П.А. Тюрина-Кузьмина исследование адренергической регуляции дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток (МСК) внесло заметный вклад в более глубокое понимание этой глобальной проблемы. Полученные данные свидетельствуют о существовании новой физиологической функции симпатoadреналовой системы – регуляции онтогенетического развития. Актуальность избранной темы обусловлена участием МСК жировой ткани не только в нормальных, но и в патологических процессах. Изучение механизмов регуляции МСК крайне

важно для разработки методов предотвращения гипертрофии жировой ткани при сахарном диабете, метаболическом синдроме, артериальной гипертензии.

Диссертация П.А. Тюрина-Кузьмина представляет собой объемный труд, вместе с приложениями представленный на 305 стр. с 253 ссылками на использованные литературные источники. Имеется 88 рисунков. Диссертация включает главы Введение, Обзор литературы, Материалы и методы исследования, Результаты и обсуждение, Заключение, а также Выводы и дополнительный материал в виде приложений.

Во Введении ясно сформулированы цель и задачи исследования, обозначены новизна, актуальность, значимость и достоверность результатов, изложены положения, выносимые на защиту и т.д.

В Обзоре литературы обобщена информация, касающаяся стволовых клеток, регуляции их дифференцировки. Рассмотрена функциональная гетерогенность стволовых клеток (раздел 1.6). Отмечено, что разнообразие СК проявляется по направленности дифференцировки, по чувствительности к гормонам-регуляторам. Подробно рассмотрены механизмы, которые могут определять разную чувствительность СК к агонистам семидоменных рецепторов. Следует отметить, что помимо цитирования вышедших в последние годы статей зарубежных авторов по данной теме, было бы хорошо упомянуть также пионерские работы, которые были выполнены в нашей стране, в том числе в Московском государственном университете им. М.В. Ломоносова еще в конце 70-х г.г. По этому разделу есть одно замечание или предложение относительно терминологии: мне кажется, что лучше писать не гомогенная, а однородная популяция клеток, а вместо функциональная гетерогенность, возможно, стоит использовать слова функциональная неоднородность или функциональное разнообразие в зависимости от того, были ли отличия заложены ранее или возникли в клетках под влиянием факторов среды. Для замены такого термина как деплеция (стр.79) хорошо было бы найти русское слово. На стр.72 описывается феномен переключения

бета-адренорецепторов с Gs- на Gi-белок. Следовало уточнить, что это явление показано для бета2-адренорецепторов.

В разделе 1.6.4 П.А. Тюрин-Кузьмин рассматривает рецепторзависимую регуляцию СК под необычным углом зрения. Дается оценка действия гормонов на разных фазах клеточного цикла, в особенности в фазе G1. Такой подход оригинален и логичен в отношении интенсивно пролиферирующих клеток. Высказана гипотеза, согласно которой в этот момент гормоны могут определять направление дифференцировки СК. Как правило, гормональную регуляцию обмена ионов кальция и других вторичных мессенджеров в дифференцированных клетках изучают, когда они прекращают деление и находятся в состоянии покоя, однако полученные таким образом результаты, вероятно, не всегда отражают физиологическое действие гормонов и нейротрансмиттеров в организме.

В разделе 1.7. дается определение мультипотентных МСК как источника дифференцированных клеток и стромы, обеспечивающей структурную и функциональную целостность ткани. В этом разделе обоснована научная значимость темы данной диссертационной работы – установление механизмов дифференцировки МСК и выявление факторов, определяющих её направление.

Методическая часть диссертационной работы (Глава 2. Материалы и методы исследования) производит сильное впечатление. Разнообразие примененных подходов и наиболее современных методов клеточной и молекулярной биологии, биоинформатики, флуоресцентной микроскопии и т.д. говорит о том, что автором выполнено большое и фундаментальное экспериментальное исследование.

Результаты и обсуждение

Первый раздел (3.1) посвящен общей характеристике МСК, описанию полученных данных о неоднородности (гетерогенности) МСК по таким признакам, как способность к дифференцировке, подвижность, чувствительность к гормонам и нейротрансмиттерам, действующим через 7-

спиральные рецепторы и системы вторичных мессенджеров Ca^{2+} и цАМФ. Впервые получены результаты, свидетельствующие, что разные Са-мобилизующие агонисты активируют разные МСК в популяции. Напротив, разные агонисты-активаторы аденилатциклазы повышают цАМФ в основном в одних и тех же клетках. В связи с этими данными хотелось бы услышать мнение соискателя, различаются ли МСК по набору рецепторов к агонистам, активирующим кальциевый обмен, а также нельзя ли объяснить первый феномен гетерологической десенситизацией. Есть небольшие замечания по оформлению и описанию условий эксперимента. На рис.3.6 отсутствует масштабный отрезок. Не указано время между добавлениями активаторов.

Из результатов первой части работы о функциональном разнообразии МСК вытекала задача выявить то функциональное состояние, из которого клетки вступают в дифференцировку по тому или другому пути (раздел 3.2). На основе анализа транскриптомов одиночных МСК, построения траекторий развития и расчета псевдовремени выявлен кластер клеток, характерный для всех направлений дифференцировки. Клетки этого кластера находятся в обратимом состоянии инициирования к переходу в дифференцировку, пролиферацию или самообновление МСК. Это новый и очень важный результат, полученный П.А. Тюриным-Кузьминым. Он также установил, что переход МСК из инициированного состояния в пролиферацию активирует фактор роста PDGF по редокс-зависимому механизму (раздел 3.3.2).

Следующей задачей было выявить факторы, влияющие на переход МСК в инициированное состояние (3.4.). Согласно полученным автором диссертации данным биоинформатического анализа, этот переход стимулирует норадреналин, выделяемый нервными окончаниями симпатической системы. Для ответа на данный вопрос сначала был проведен поиск адренорецепторов (АР), опосредующих действие норадреналина в МСК (раздел 3.4.2). С помощью иммуофлуоресцентного окрашивания были идентифицированы АР на плазматической мембране МСК. Были выявлены основные разновидности альфа1- и альфа2-АР, а также бета1-, 2- и 3-АР.

Интересно, что по экспрессии АР у МСК разных доноров выявлена значительная вариабельность, а уровень экспрессии бета3-АР был почти на фоновом уровне, хотя, как отмечает П.А. Тюрин-Кузьмин, литературные данные говорят о достаточно высоком уровне экспрессии бета2/3-АР в стволовых клетках. Возможно, эти исследования стоило дополнить регистрацией иммунофлуоресцентного окрашивания МСК антителами к бета2/3-АР на плашке в более щадящих условиях, чем в опытах с клетками, снятыми с поверхности трипсином. П.А. Тюрин-Кузьмин показал, что только небольшая часть клеток, экспрессирующих альфа1-АР и альфа2-АР, отвечают подъемом уровня ионов кальция в ответ на норадреналин. Как вытекает из последующих экспериментов, это скорее всего вызвано недостаточным количеством альфа1А-АР в клетках – их не хватает для активации подъема концентрация цитоплазматического кальция до порогового уровня, вызывающего Са-индуцированный выброс кальция из ретикулула. После чтения раздела 3.4.2. (стр.158) мне осталось непонятным, поднимает ли норадреналин уровень Са²⁺ в цитоплазме через альфа1-АР и альфа2-АР в разных клетках или есть клетки, где в ответе задействованы оба типа рецепторов. В связи с этим встает вопрос, добавляли ли празозин и атипамезол последовательно к одной популяции МСК или антагонисты добавляли к клеткам в разных лунках? Какой процент клеток переставал отвечать на норадреналин при одновременном блокировании альфа1-АР и альфа2-АР, если такой эксперимент ставился? Известно, что активация альфа2-АР может потенцировать кальциевые ответы от других рецепторов (Негреску Е.В., Балденков Г.Н., Григорян Г.Ю., Мазаев А.В., Ткачук В.А. 1989). Возможно, такой механизм реализуется в МСК.

Часть диссертации посвящена изучению того, как происходит сенситизация МСК к норадреналину через альфа1А-АР под действием норадреналина. В результате тщательных исследований П.А. Тюрин-Кузьмин открыл механизм этого явления – установлена роль бета3-АР, цАМФ и протеинкиназы А в усилении ответа на норадреналин путем

индукции экспрессии рецепторов. Увеличение экспрессии альфа1A-AP происходит не в результате усиления транскрипции, а по другому механизму. В порядке дискуссии хотелось бы узнать мнение автора диссертации, каков может быть этот механизм.

Совершенно логичной была постановка вопроса о инструктивной роли альфа1A-AP в дифференцировке МСК. Установлено, что бета3-адренорецептор-зависимая инициация клеток и увеличение экспрессии альфа1 AP, их активация норадреналином вызывает дифференцировку в сторону контрактильного фенотипа или в сторону бежевых адипоцитов. Напротив, адипогенез при активации бета3-AP и альфа1A-AP подавляется.

В разделе 3.5. диссертации П.А. Тюрина-Кузьмина приводит данные, доказывающие связь между степенью повышения чувствительности МСК пациентов с ожирением к норадреналину после предварительной стимуляции в этих клетках бета3-AP и наличием у пациентов артериальной гипертензии. Эти результаты имеют, как мне кажется, большое практическое значение, т.к. открывают перспективы терапии ожирения и сопутствующей гипертензии с помощью агонистов бета3-AP и активаторов синтеза цАМФ в комбинации с лигандами альфа1A-AP.

Гипотеза о необходимости последовательной активации бета3- и альфа1A-адренорецепторов для дифференцировки МСК в бежевые адипоциты подтверждена в экспериментах *in vivo*. По этому разделу диссертации есть небольшие замечания. На рис.3.62 нет масштабной линейки. Не указано, что изображено на верхней справа фотографии – на ней не указаны белые и бежевые адипоциты. В подписи к рис.3.61 на масштабном отрезке написано μM (микромоль) вместо μm (микрометры). Эти, как и другие замечания, отмеченные выше, являются чисто техническими. Они ни в коей мере не влияют на качество диссертационной работы. Автореферат в полной мере отражает основное содержание диссертационной работы.

Давая оценку в целом исследованиям, проведенным П.А. Тюриным-Кузьминым хотел бы отметить, что он взялся за очень сложную тему. При выполнении диссертационной работы он нашел подходы к решению ряда важных задач и эти подходы могут быть использованы в дальнейших научных исследованиях. Автор диссертации сделал фундаментальные выводы относительно процессов дифференцировки МСК, убедительно подтвердив их экспериментальными данными. Сейчас можно говорить о переходе молекулярной эндокринология на новый уровень, связанный с решением задач биологии развития. Считаю, что П.А. Тюрин-Кузьмин внёс ощутимый вклад в эту область науки. Результаты диссертационной работы могут быть рекомендованы для включения в курсы лекций и практических занятий студентам Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова и других медико-биологических ВУЗов нашей страны.

В итоге можно заключить, что диссертация П.А. Тюрина-Кузьмина отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 1.5.5 – «Физиология человека и животных» (биологические науки), а именно следующим ее направлениям: «Изучение закономерностей и механизмов поддержания постоянства внутренней среды организма человека и животных; механизмов функционирования клеток, тканей, органов, принципов их системной организации», «Анализ механизмов нервной и гуморальной регуляции, генетических, молекулярных, биохимических процессов, определяющих динамику и взаимодействие физиологических процессов и функций человека и животных», а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5, и оформлена, согласно приложениям № 5, 6 Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова. Таким образом, соискатель Тюрин-Кузьмин Петр Алексеевич

заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.5 – «Физиология человека и животных».

«02» мая 2024 г.

П.В. Авдонин