

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу

Шишкиной Татьяны Викторовны

**«Антигипоксическое и нейропротективное действие глиального нейротрофического фактора при моделировании факторов ишемии»,
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.01 – физиология.**

Актуальность темы диссертации

Исследования механизмов реагирования мозга на ишемию неизменно актуальны в течение десятилетий. Важный раздел в этих исследованиях занимает изучение пластичности в работе нейронных сетей. Огромное значение имеет поиск веществ, способных не только защитить клетки головного мозга от ишемического повреждения и активировать в них репаративные процессы при реперфузии, но и восстанавливать структуру и активность нейронных сетей. Современным подходом является изучение функционирования нервной системы на уровне именно нейронных сетей, а не единичных нейронов. Нейронная сеть в настоящее время рассматривается как минимальная функциональная единица центральной нервной системы, обеспечивающая консолидацию, хранение и передачу информации. Прежние подходы нейрофармакологии базировались в основном на использовании препаратов, стимулирующих микроциркуляцию, холинорецепцию и антиоксидантную защиту в мозге. В настоящее время перспективным и актуальным видится применение в качестве корректоров ишемического повреждения веществ эндогенного происхождения. К ним в первую очередь относятся нейротрофические факторы. Находясь в русле этого тренда, автор исследует эффект и механизмы нейропротективного влияния одного из наиболее мощных нейротрофических факторов - нейротрофического фактора, выделенного из культуры глиальных клеток (GDNF).

Научная новизна результатов исследования.

В диссертации впервые проведено исследование влияния GDNF на спонтанную нейросетевую активность культуры диссоциированных клеток гиппокампа в норме и при воздействии двух основных факторов ишемии - гипоксии и гипогликемии. Сама по себе модель раздельного применения этих двух факторов *in vitro* представляется новой по сравнению с классической моделью кислородно-глюкозной депривации (OGD).

В поиске возможных механизмов протективного влияния GDNF на нейроны мозга и организацию нейрональных сетей автор опирается на сведения о том, что GDNF способен стимулировать промоторную активность GluR2-субъединиц AMPA-рецепторов, играющих важную роль не только в предохранении нейронов от ишемической и постишемической кальциевой перегрузки, но и в синаптогенезе и формировании нейронной сети, а также в синаптической пластичности. Автор впервые на своей модели *in vitro* показывает, что GDNF стимулирует экспрессию мРНК GluR2-субъединицы при гипоксии.

В разделе экспериментов *in vivo* впервые выявлен позитивный прекодиционирующий эффект определенных концентраций GDNF не только на жизнеспособность животных в условиях тяжелой (летальной) гипобарической гипоксии, но и на состояние их долговременной пространственной памяти, что является дополнительным подтверждением существования и возможности стимуляции GDNF – зависимого механизма, препятствующего разрушению нервных сетей при гипоксии.

Теоретическая и практическая значимость работы.

Результаты, полученные диссертантом, расширяют представления о роли нейротрофических факторов, в частности GDNF, в активации эндогенных нейропротективных механизмов, противостоящих повреждающему действию факторов ишемии на нейроны и нейронные сети. Исследования в данном направлении позволяют разрабатывать

принципиально новые фармакологические подходы в профилактике и лечении нейродегенеративных и дезинтеграционных нарушений в нервной системе человека, вызываемых ишемией.

Характеристика содержания диссертации.

Диссертация Шишкиной Т.В. написана в традиционном формате. *Обзор литературы* четко разбит на подразделы, имеющие отношение к последующему изложению, и дает исчерпывающее представление о современном состоянии знаний по выбранной теме. Впрочем, некоторые описания представляются излишне подробными, в частности, описание всего семейства глиального нейротрофического фактора, их рецепторов и сигнальных путей. Раздел *Методы* описывает примененные автором схемы и техники адекватные поставленным задачам. Одно из бесспорных достоинств методического подхода *in vitro* заключается в использовании неинвазивной регистрации биоэлектрической и метаболической активности и прижизненной детекции экспрессии мРНК в гиппокампальной культуре. Успешное сочетание подходов *in vitro* и *in vivo* позволяет автору раскрыть специфику нейропротективного действия GDNF от молекулярного до поведенческого уровня. *Результаты* описаны подробно, данные грамотно обработаны и хорошо проиллюстрированы. Автор успешно совмещает изложение каждого из результатов с его обсуждением. *Заключение и выводы* написаны ясно и однозначно трактуют достоверность полученных результатов. *Список литературы* составлен по требуемой форме, безошибочно и в полном соответствии с текстовыми ссылками. *Автореферат диссертации* полностью отражает основные положения работы, ее содержание и выводы.

Апробация результатов исследования.

Полученные результаты были представлены на V съезде биофизиков России, на 4-х российских и 4-х международных конференциях. Материалы

опубликованы в 29 печатных работах, из которых: 4 статьи и 2 тезисов докладов опубликованы в рецензируемых отечественных и международных изданиях, индексируемых в базах WS и Scopus.

Вопросы диссертанту.

Некоторые фрагменты описания методики и результатов представляются не полно или неудачно выраженными. Хотелось бы услышать от автора соответствующие пояснения.

Методы: раздел 2.3.2. Из текста ясно, что газовый состав исходного (нормоксического) инкубационного раствора для культуры поддерживался путем его насыщения газовой смесью «95% воздуха и 5% CO₂». Для создания гипоксической среды автор использует раствор, насыщенный аргоном, а не традиционную смесь N₂:CO₂=95%:5% или чистый N₂. Такой подход предполагает, что аргон должен вытеснить из раствора не только кислород, но и N₂ и CO₂. Возникает вопрос, (1) *насколько близка «аргоновая» имитация гипоксии к естественной ситуации и не приносит ли она артефакторы «гипонитрии» и «гипокапнии»?* Здесь же автор указывает, что при моделировании гипоксии концентрация кислорода снижалась в 10 раз. (2) *Не ясно, каким методом это было установлено?*

Результаты: раздел 3.2.7. При оценке выживаемости мышей в условиях ОГБГ автор делит животных всех экспериментальных серий на 3 подгруппы высоко-, средне- и низко-устойчивых к гипоксии (ВУ, СУ, НУ). И далее пишет, что в GDNF-прекондиционированных животных по сравнению с контролем это соотношение менялось в сторону ВУ. На мой взгляд, деление животных на 2 или 3 группы по устойчивости к гипоксии общепринято только для контрольного массива и характеризует фенотипическое разнообразие животных только по реакции на гипоксию. Таким образом, заявление о том, что соотношение ВУ, СУ и НУ животных меняется в результате введения антигипоксических средств, *считаю неудачным*. Очевидно, здесь речь идет о повышении средней устойчивости к

гипоксии в массиве прекондиционированных животных, исходный фенотипический состав которого не известен. Для того, чтобы охарактеризовать эффект препарата на ВУ, СУ и НУ подгруппы, необходимо было бы каждую из них «спустить» сразу по достижении агональных признаков, оставив живыми, затем ввести препарат и «поднять» вторично. Впрочем, это дополнительная и довольно интересная задача, которую автор не ставил.

Заключение.

Диссертационная работа Шишкиной Татьяны Викторовны «Антигипоксическое и нейропротективное действие глиального нейротрофического фактора при моделировании факторов ишемии» является законченной научной квалификационной работой. В диссертации представлены новые данные о нейропротективном эффекте GDNF на организацию нейронных сетей в гиппокампальной культуре при имитации ишемии *in vitro*, причем отдельно гипоксического и гликемического ее факторов. Новым и практически значимым представляется обнаружение *in vivo* антигипоксического и «про-когнитивного» эффекта интраназального введения GDNF определенных концентраций. На субклеточном уровне современными ювелирными методами автор впервые показал протектирующий эффект GDNF на транскрипцию мРНК GluR2 субъединицы АМПА рецептора, вскрывая один из возможных, дополнительных, механизмов защиты отдельных нейронов и пластичности межнейронных отношений от воздействия гипоксии.

По актуальности темы, методическому уровню, объему полученных результатов и их теоретической и практической значимости диссертация Т.В. Шишкиной «Антигипоксическое и нейропротективное действие глиального нейротрофического фактора при моделировании факторов ишемии», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, соответствует требованиям, предъявляемым ВАК РФ к кандидатским

диссертациям (п.9 «Положение о присуждении ученых степеней»,
утвержденного Постановлением правительства РФ № 842 от 24 сентября
2013 г.), а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата
биологических наук по специальности 03.03.01 – физиология.

Официальный оппонент

Доктор биологических наук, профессор, ведущий научный сотрудник
Федерального государственного бюджетного учреждения науки

Института физиологии им. И.П.Павлова РАН

Адрес: Санкт-Петербург, наб. Макарова, д.6

Телефон: +7 905 280 05 63

Электронная почта: dsem50@rambler.ru

«06» марта 2017

Германович



Семенов Дмитрий

Подпись руки Семенов Д.Г.
удостоверит _____
Док. _____
Сидр.