

## ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу Сахарновой Татьяны Александровны на тему «Нейротропное и антигипоксическое действие нейротрофического фактора головного мозга (BDNF) *in vivo* и *in vitro*», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук в специализированный диссертационный Совет Д 002.020.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт физиологии им.И.П.Павлова РАН» по специальности 03.03.01 – физиология

### Актуальность избранной темы

Рецензируемая диссертация является современным исследованием, посвященным актуальной проблеме - исследованию нейротропного и антигипоксического действия нейротрофического фактора головного мозга (BDNF) *in vitro* и *in vivo*. В настоящее время BDNF - один из наиболее активно исследуемых нейротрофинов. Известно, что BDNF не только способствует росту, дифференцировке нейронов, но также активно влияет на синаптическую передачу, синаптогенез, долговременную синаптическую пластичность. Кроме того, показано, что BDNF является важным нейропротектором при различных повреждениях мозга, обладая комплексом антиапоптотических, противовоспалительных и даже противозипилептических свойств.

В диссертационной работе систематически исследуется вопрос о влиянии BDNF на спонтанную биоэлектрическую активность нейронных сетей культуры диссоциированных клеток гиппокампа в зависимости от стадии их развития *in vitro*, изучаются ранние и отдаленные эффекты антигипоксического действия BDNF на функционирование и жизнеспособность клеток *in vitro*. Несомненным достоинством работы являются попытки автора выявить механизм антигипоксического действия BDNF, используя нейрофармакологические методы. Другой важной особенностью работы является то, что автор не ограничивается только экспериментами с культурой нейронов, а продолжает свои исследования *in vivo*, изучая эффекты интраназального введения BDNF на выживаемость, двигательную активность, сохранение и воспроизведение долговременной памяти у экспериментальных животных, подвергнувшихся гипоксическому воздействию. Поэтому актуальность данного исследования.

### Научная новизна

Автором работы выполнена серия исследований с использованием разнообразных современных методов и подходов. В частности, для анализа нейросетевой активности в культуре клеток гиппокампа используется мультиэлектродная система регистрации внеклеточных потенциалов действия, которая позволяет выявить пространственно-временные паттерны и

динамику спонтанной электрической активности в нейронных сетях. Благодаря этому и другим методам получен комплекс новых экспериментальных данных.

Выявлен дозозависимый нейротропный эффект BDNF на биоэлектрические показатели функционального состояния нейронных сетей первичной культуры гиппокампа в зависимости от стадии ее развития *in vitro*.

На разработанной с участием автора модели острой нормобарической гипоксии *in vitro* Сахарновой Т.А. показано антигипоксическое действие превентивной аппликации BDNF, выражающееся в поддержании морфологической и функциональной целостности нейронных сетей культур диссоциированных клеток гиппокампа как во время гипоксии, так и в отдаленном постгипоксическом периоде, выявлен механизм этого эффекта – через взаимодействие белка с тирозинкиназным рецептором B (TrkB).

Показано, что превентивное интраназальное введение BDNF, 4 мкг/кг и 40 мкг/кг способствует выживаемости животных на «смертельной площадке», увеличению устойчивости животных к гипоксии, а также сохранению следов долговременной пространственной памяти, двигательной и исследовательской активности в постгипоксическом периоде.

В целом, полученные автором диссертации собственные данные являются убедительными, приоритетными, носят фундаментальный характер, расширяют современные представления об эффектах действия BDNF

#### **Степень обоснованности и достоверность научных положений, выводов, сформулированных в диссертации**

Выносимые на защиту положения и выводы базируются на анализе совокупности полученных данных, лаконично сформулированы, конкретны. Они весомы, обоснованы собственными, в ряде случаев уникальными, материалами, полученными с помощью комплекса современных физиологических методов исследований: электрофизиологической регистрация активности нейронных сетей, оценки жизнеспособности клеток в культуре, моделирования гипоксии *in vivo* и *in vitro*, проведения поведенческих тестов. Корректное использование данных методик позволило автору собрать достаточный объем материала для дальнейшего проведения адекватного математического и статистического анализа полученных данных.

#### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Диссертационная работа Сахарновой Т.А. расширяет теоретические знания о роли нейротрофического фактора BDNF в функционировании мозга, что представляет определенную научную значимость для физиологии. Более того, результаты диссертационной работы могут быть использованы для целей практической нейробиологии. На основе полученных автором результатов, свидетельствующих о выраженном антигипоксическом и

нейропротекторном действии нейротрофического фактора головного мозга, в перспективе представляется возможным разработать новые терапевтические подходы в коррекции ишемических процессов в нервной ткани при нейрососудистых заболеваниях.

### Общая характеристика работы

Диссертация состоит из 142 страниц текста и включает введение, обзор литературы (гл. 1), описание методов исследования (гл. 2), результаты исследования и их обсуждение (гл. 3). Затем следует заключение, выводы и список литературы, включающий 192 источника. Диссертация иллюстрирована 28 рисунками и 4 таблицами. Рисунки (схемы и графики) в целом информативны, качественно выполнены, что демонстрируют достоверность полученных данных и профессиональное мастерство автора.

Во введении имеется вполне обоснованная и хорошо аргументированная постановка задачи исследования, приведена общая характеристика работы.

Литературный обзор заслуживает высокой оценки. Он хорошо написан, основан на анализе современной научной литературы и в достаточной степени знакомит читателя с основными вопросами, касающимися строения, регуляции экспрессии гена и белка BDNF, рецепторов к BDNF. Автор подробно описывает влияние BDNF на синаптическую передачу, нейропротекторные свойства данного белка. Особое внимание автор уделяет вопросу моделирования гипоксии *in vitro* и *in vivo* и роль BDNF в коррекции ишемических состояний мозга. Также в литературном обзоре даются современные сведения о нейросетевом подходе в изучении активности мозга.

*В качестве замечаний по литературному обзору отмечу следующие моменты:*

1) Не все литературные ссылки обзора полностью выверены. Например, на стр. 16 некорректно приведены ссылки на работу Castren E. et al., 1992. Далее в тексте диссертации говорится, «что у пациентов с болезнью Альцгеймера наблюдалось снижение уровня экспрессии мРНК BDNF в гиппокампе», а в статье, на которую ссылается автор (Ferrer I. et al., 1999) речь идет о содержании белка, а не мРНК; далее автор пишет, что «при болезни Паркинсона снижался уровень белка BDNF в черной субстанции», тогда как в цитируемой работе (Howells D.W. et al., 2000) речь идет об экспрессии мРНК. Ссылка №1, приведенная в списке литературы (Агрба и Мухина, 2013) в работе не используется.

2) Не все ссылки на собственные работы автора, приведенные в автореферате и используемые в диссертации, приведены в списке литературы (требование п. 14 Положения)

3) Автор одновременно использует англоязычные и русскоязычные названия для одного и того же вещества в соседних предложениях, что затрудняет восприятие. Например, автор пишет о медиаторе ГАМК, но «GABAергической передаче» и «GABAa-рецепторах» (стр. 24). Для веществ, у которых есть устоявшиеся русскоязычные названия, лучше использовать их.

Методы. В диссертации достаточно детально описаны методики, использованные в работе. В исследованиях *in vitro* автор применил современный электрофизиологический метод регистрации внеклеточных потенциалов действия, характеризующий спонтанную биоэлектрическую активность нейронных сетей культур диссоциированных клеток гиппокампа, на разработанной модели острой нормобарической гипоксии провел оценку жизнеспособности клеток и их функционального состояния в отдаленном постгипоксическом периоде. В исследованиях *in vivo* диссертантом использована известная методика моделирования острой гипобарической гипоксии, которая широко применяется для изучения препаратов антигипоксического действия. Для оценки когнитивных функций использованы классические поведенческие тесты.

Количество экспериментального материала (более 160 культур диссоциированных клеток гиппокампа и 58 животных для исследований *in vivo*) является достаточным для получения обоснованных и достоверных результатов.

*Из текста не совсем понятно, как вычислялся коэффициент защиты (стр. 55). Автор указывает, что его оценивали по изменению времени жизни опытных животных, однако в приведенной формуле учитывается только число выживших животных.*

Результаты исследования в целом хорошо документированы, грамотно обработаны и проанализированы статистически, изложены четко и логично, обсуждаются по ходу изложения материала.

В первой части результатов автор подробно описывает влияние BDNF на спонтанную биоэлектрическую активность первичных культур гиппокампа на разных этапах развития *in vitro*. Автор прослеживает действие однократной аппликации белка в течение первых 20-30 минут, а затем смотрит более отдаленные последствия через 2 и 24 часа. В качестве критериев биоэлектрической активности используются ряд численных показателей: количество малых сетевых пачек, количество спайков в сетевой пачке, длительность малой сетевой пачки импульсов. Автор показывает, что, начиная с 14 дня культивирования, BDNF транзиторно увеличивает длительность сетевой пачечной активности при отсутствии изменений в количестве спайков и уменьшении времени появления первых спайков нейронов при формировании спонтанной сетевой пачки. Этот эффект являлся дозозависимым. В работе обсуждаются возможные механизмы действия BDNF на сетевую активность, однако, экспериментально эти гипотезы не проверяются. Эксперименты, направленные на изучение механизма этого явления, могут быть сделаны диссертантом в дальнейшем и послужат основой для качественной публикации.

В качестве **методического замечания** следует отметить, что рисунки с паттернами активации спонтанной биоэлектрической активности (рис. 9, 11 и 13, а в следующей части результатов рис. 17) имеют разные цветовые кодировки для времени появления спайков в

сетевой малой пачке, что сильно затрудняет визуальный анализ, а статистических тестов для данного параметра автор не приводит.

Во втором разделе результатов автор исследует антигипоксическое действие нейротрофического фактора головного мозга в условиях нормобарической гипоксии *in vitro*. Для этих экспериментов автор использует зрелые культуры гиппокампа (на 33-40 день культивирования). К сожалению, **в работе не объясняется**, почему для этой части работы были взяты зрелые культуры (33-40 DIV), а не культуры на более ранних этапах развития, как в предыдущей части (7, 14, 21 DIV). В работе **остается нераскрытым вопрос**, как влияет сам BDNF на спонтанную биоэлектрическую активность зрелых культур без воздействия фактора гипоксии, так как контрольный эксперимент такого рода не проведен.

Автор выявляет, что BDNF обладает выраженными антигипоксическими свойствами при аппликации в концентрации 1 нг/мл за 20 мин до острой нормобарической гипоксии, проявляющимися в сохранении спонтанной сетевой активности нейронов во время острой гипоксии, а также предотвращает последующие нарушения сетевой активности, а также гибель клеток. В работе скрупулезно прослежено, как изменяется сетевая активность в момент гипоксии, а также через 1, 3 и 7 суток. Однако данные о том, что происходит в нейронной сети непосредственно вслед за реоксигенацией, в период, когда можно предполагать существенные изменения в работе нейронов, достаточно скупы.

**Значимым достоинством работы** является попытка автора выяснить механизм защитного действия BDNF, чего диссертант использует селективный антагонист TrkB рецептора - k252a. В работе показано, что применение k252a (150 нМ) полностью нивелирует положительные эффекты BDNF (1 нг/мл) при действии гипоксии, что позволило автору сделать обоснованный вывод, что все положительные эффекты, оказываемые нейротрофическим фактором головного мозга во время гипоксии, связаны с TrkB-рецептором.

Важной и интересной частью этого раздела работы стала оценка жизнеспособности культуры после гипоксии. Однако изложение этих результатов слишком краткое, поэтому **некоторые методические моменты остаются неясными и требуют уточнения**. Известно, что в зрелых культурах количество глиальных клеток существенно нарастает, а при гипоксии наблюдается гибель как нейронов, так и глиальных клеток.

1) Была ли автором проведена попытка выявить, в какой пропорции гибнут нейроны и глиальные клетки? Наличие микрофотографий с иллюстрацией живых и мертвых клеток представляется необходимым.

2) Различается ли действие BDNF на поддержание жизнеспособности нейронов и глиальных клеток (по литературным данным и/или по собственным наблюдениям автора)?

3) Можно предположить, что оценка жизнеспособности клеток в разные сроки проводилась в параллельных сериях эксперимента. Так ли это? Желательно указать это в методике. Что послужило основанием для выбора именно этих сроков (через 3 и 7 суток)?

4) Так как смена питательных растворов проводилась раз в 3 дня, то происходило ли при этом частичное удаление мертвых клеток? Примерно равный процент мертвых клеток через 3 и 7 суток может свидетельствовать как о том, что дополнительной гибели клеток в сроки от 3 до 7 суток не происходило, либо гибель продолжалась, но часть мертвых клеток была удалена вместе с раствором. Какой вариант вероятнее, какие аргументы в пользу того или иного варианта может привести автор?

В третьей части результатов автор исследует антигипоксическое действие нейротрофического фактора головного мозга в условиях гипоксии *in vivo*. Во-первых, исследуется как интраназальное введение BDNF влияет на выживаемость животных при моделировании острой гипобарической гипоксии, а затем на показатели двигательной и ориентировочно-исследовательской активности мышей в тесте «Открытое поле» и на показатели научения и долговременной памяти мышей в тесте «Водного лабиринта Морриса». Эти поведенческие тесты надежны и полностью соответствуют поставленным автором задачам. Проведенные диссертантом эксперименты подтверждают, что фактор BDNF обладает выраженными антигипоксическими свойствами, повышает выживаемость животных при гипоксии и препятствует развитию у них когнитивных нарушений, вызываемых гипоксией.

*При прочтении этой части работы возникли следующие вопросы и замечания:*

1) Как были выбраны именно такие дозы BDNF (4 мкг/кг и 40 мкг/кг) и почему было выбрано интраназальное введение? Во многих работах отмечается, что BDNF не эффективен *in vivo*, так как плохо проникает через биологические барьеры (см. обзор Pardridge WM, 2007). Есть ли у автора какие-то дополнительные подтверждения, что BDNF достигал структур мозга?

2) Фраза на стр. 88 «Установлено, что у 62,5% животных данной группы время, затраченное на попытки уверенно встать на конечности, достоверно отличалось от показателей как группы с инъекцией антигипоксанта ( $p < 0,01$ ), так и контрольной группы ( $p < 0,05$ )» требует пояснения. Следует ли из отсюда, что для сравнения отбиралась только часть животных? Если да, то на основании чего?

3) В тексте на стр. 91 сказано, что «При тестировании животных в «открытом поле» выявлено, что исходный уровень горизонтальной активности статистически не отличался во всех группах животных (рис. 23)», однако на данном рисунке приведены нормированные значения (все равны 1), что не может служить подтверждением.

4) Как эксперименты *in vitro*, описанные в предыдущих разделах, помогают интерпретировать результаты экспериментов *in vivo*?

В заключении кратко приводятся основные этапы и результаты исследовательской работы. Выводы диссертационного исследования логически вытекают из изложенных результатов, соответствуют поставленным в работе цели и задачам.

### **Заключение по диссертационной работе**

По объему выполненной работы, актуальности, научной новизне основных положений, целостности, законченности, практической значимости и публикациям диссертационная работа Сахарновой Т.А. «Нейротропное и антигипоксическое действие нейротрофического фактора головного мозга (BDNF) *in vivo* и *in vitro*» полностью соответствует критериям кандидатской диссертации, изложенным в Разделе II «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, а её автор – Татьяна Александровна Сахарнова заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.01 - Физиология.

### **Официальный оппонент по диссертации:**

Заведующий лабораторией

Молекулярных механизмов межнейронных взаимодействий

Федерального государственного бюджетного

учреждения науки Института эволюционной

физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова

Российской академии наук

Доктор биологических наук

Зайцев Алексей Васильевич

Подпись Зайцева А.В. заверяю.

Ученый секретарь Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук

Кандидат биологических наук

«12» февраля 2015 г.



Е.Н. Ребане

Адрес: 194223, г. Санкт-Петербург, пр. Тореза, д. 44. Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук. тел.: 8(812) 552-30-12; e-mail: aleksey\_zaitsev@mail.ru