

САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Баранова Татьяна Ивановна

Доктор биологических наук, старший научный сотрудник кафедры общей физиологии

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Чуриловой Анны Викторовны
«Исследование влияния различных режимов гипобарической гипоксии на экспрессию транскрипционных факторов и про-адаптивных белков в мозге крыс», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.01 – физиология

Актуальность темы. Изучение механизмов, обеспечивающих устойчивость организма к экстремальным факторам среды является центральной задачей современной адаптационной физиологии. Сложившаяся в настоящее время концепция адаптации, базирующаяся на трудах, Л.А. Орбели, Г. Селье, исследованиях А.Д. Слонима, В.И. Медведева, Ф.З. Меерсона, А.Н. Агаджаняна и др., хорошо описывает общие системные механизмы. На основе этой концепции сложилось особое направление – адаптационная медицина, одной из важнейших задач которой является разработка способов повышения адаптационных резервов организма, основанных на активации защитных механизмов. Именно в этом аспекте выполнена данная работа. Работа посвящена изучению активации молекулярно-клеточных механизмов повышения адаптивных возможностей мозга посредством влияния на организм гипобарической гипоксии различной интенсивности, а точнее – изучению феномена гипобарического гипоксического прекондиционирования. Несмотря на то, что впервые эффект прекондиционирования на примере повышения резистентности миокарда к ишемическому воздействию в результате повторяющихся кратковременных эпизодов сублетальной ишемии/гипоксии был описан еще в 80-е годы прошлого столетия (Murry, Jennings и Reimer В 1986), механизмы его до сих пор остаются недостаточно изученными. В работе исследуются нейропротективные механизмы, лежащие в основе гипоксического прекондиционирования, точнее – роль активационных и лиганд-зависимых транскрипционных факторов, а также белков BDNF и Bcl-2. В связи с этим работа безусловно является актуальной и соответствует передовому краю науки.

Цель и задачи исследований. Цель работы сформулирована четко и конкретно, полностью соответствуют теме и направлена на выяснение нейропротективных молекулярных механизмов, индуцируемых прекондиционированием гипобарической гипоксией.

Задачи выстроены логично и направлены на достижение поставленной цели. Используемый в работе гистологический метод - окраски по Ниссля, дал возможность оценить морфологические повреждения нейронов неокортекса и гиппокампа тяжелой гипобарической гипоксией, а также эффективность протективного действия различных режимов preconditionирования умеренной гипоксией. Посредством иммуноцитохимического метода исследованы особенности экспрессии активационных (pCREB, NF-kappaBp65, c-Rel) и лиганд-зависимых (минералокортикоидных и глюкокортикоидных рецепторов) транскрипционных факторов, а также продуктов генов мишеней этих транскрипционных факторов - про-адаптивных белков нейротрофина BDNF и антиапоптотического фактора Bcl-2 при действии preconditionированной тяжелой гипоксии, а также при предварительном однократном или трехкратном preconditionировании с помощью умеренной гипобарической гипоксии в нейронах неокортекса и гиппокампа.

При этом установлено, что одной из причин повреждения и гибели нейронов неокортекса и гиппокампа при действии тяжелой гипоксии является подавление или недостаточная экспрессия активационных транскрипционных факторов (pCREB, NF-kappaBp65, c-Rel) и нарушение баланса в уровне экспрессии между глюко- и минералокортикоидными рецепторами, а также обусловленное этим подавление экспрессии продуктов их генов мишеней - про-адаптивных белков BDNF и Bcl-2. Доказано, что одним из ключевых нейропротективных механизмов preconditionирования, является индукция экспрессии активационных и лиганд-зависимых транскрипционных факторов, а также про-адаптивных белков BDNF и Bcl-2.

Научная новизна

Автором впервые проанализирована эффективность коррекции нарушений, вызванных тяжелой гипобарической гипоксией двумя различными режимами preconditionирования (однократным и трехкратным). При этом убедительно доказано, что однократное preconditionирование не оказывает протективный эффект, а трехкратное preconditionирование предотвращает структурные повреждения нейронов и повышение экспрессии исследуемых молекулярных факторов. Показано также, что только трехкратное (а не однократное) preconditionирование предотвращает нарушения регуляции ГГАС, вызванные тяжелой гипоксией и связанные с особенностями экспрессии глюко- и минералокортикоидных рецепторов. Только при трехкратном, а не однократном, предъявлении умеренной гипобарической гипоксии наблюдается выраженная кооперативная активация исследуемых транскрипционных факторов и про-

адаптивных белков, что имеет важное значение для формирования механизмов толерантности нейронов неокортекса и гиппокампа к повреждающим воздействиям.

Научно-практическая значимость.

Совокупность полученных диссертантом результатов свидетельствует о том, что трехкратное прекондиционирование умеренной гипобарической гипоксией может лечь в основу разработки эффективного немедикаментозного способа повышения резистентности мозга и организма в целом к повреждающим воздействиям за счет индукции эндогенных протективных механизмов, включающих оптимизацию функции гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальной системы, а также модификацию активности транскрипционных факторов про-адаптивных генов и повышение экспрессии кодируемых ими белков.

Достоверность и обоснованность выводов и положений.

Экспериментальные исследования Анны Викторовны проведены на 78 взрослых самцах крыс *Rattus norvegicus* линии Вистар весом 200-250 г., содержащихся в стандартных условиях. Животные были разделены на 6 репрезентативных экспериментальных групп: 1 - крысы, подвергнутые действию ТГ; 2, 3 - крысы, подвергнутые действию умеренной гипоксии однократно или трехкратно; 4, 5 - крысы, подвергнутые действию ТГ через сутки после последнего сеанса однократного или трёхкратного ПК. Результаты, полученные на животных, подвергавшихся гипобарической гипоксии, сопоставлялись с данными, полученными на животных контрольной группы, которые на 2 часа помещались в барокамеру без изменения атмосферного давления.

Для сравнения выборок (опыта и контроля) использовали однофакторный дисперсионный анализ ANOVA. Полученные экспериментальные данные тщательно проанализированы, статистически обработаны с использованием современных компьютерных программ. Это позволяет сделать заключение, что приведенные диссертантом результаты исследований являются надежными, высоко достоверными, а вытекающие выводы и основные положения, выносимые на защиту, логичны, аргументированы, соответствуют поставленным задачам.

Методическое оснащение соответствовало достижению цели и решению поставленных задач. Оценка повреждения нейронов неокортекса и гиппокампа тяжелой гипобарической гипоксией, а также протективного эффекта умеренной гипобарической гипоксии осуществлялась традиционным гистологическим методом – окраской по Нислю. Для определения содержания белков pCREB, субъединиц p65 и c-Rel NF- κ B, глюко- и минералокортикоидных рецепторов, BDNF, Bcl-2 в неокортексе и гиппокампе

крыс, подвергнутых гипоксическому воздействию в разных режимах использован иммуноцитохимический способ. При этом количественная обработка этих результатов проведена посредством системы компьютерного анализа изображения с программным обеспечением ВидеоТест Мастер Морфология 5.2 (разработка ООО “Видео Тест”, Санкт-Петербург). Исследования А.В. Чуриловой выполнены на высоком методическом уровне, ею задействован арсенал вполне современных приборов, программ и методов обработки полученных данных, что дает право квалифицировать полученный автором экспериментальный материал как соответствующий высокому уровню.

Структура рукописи и оформление работы. Объем рукописи составляет 155 страниц. Полученные А.В. Чуриловой данные обстоятельно описаны, проанализированы, тщательно задокументированы, представлены в виде 60 иллюстраций – 58 рисунков и фотографий и 2 таблиц. Диссертация построена по классическому принципу - состоит из введения, 3 глав, выводов, и указателя использованной литературы. Первая глава посвящена обзору исследований в рассматриваемой области. Автором всесторонне на системном и молекулярно-клеточном уровне проанализированы механизмы толерантности мозга, активируемые гипоксическим прекондиционированием, роль индуцибельных и активационных транскрипционных факторов – ключевых регуляторов экспрессии генома клеток – в развитии фазы экспрессии толерантности, а также генов про-адаптивных белков – нейротрофического BDNF и анти-апоптического факторов Bcl-2. Список проанализированной литературы включает 427 источников, из них 35 отечественных автора, остальные - работы зарубежных авторов, в основном за последние 10 лет. Вторая глава посвящена описанию моделей прекондиционирования, дизайну исследования, используемых методов и статистической обработке полученных данных. Третья глава посвящена изложению, анализу и обсуждению полученных результатов.

В целом оформление диссертации соответствует требованиям ВАК, работа изложена правильным русским языком, хорошо отредактирована, экспериментальный материал в полном объеме отображен в рисунках и фотографиях, которые аккуратно оформлены.

Оценка наиболее значимых результатов.

К наиболее значимым результатам работы следует отнести анализ вовлечения транскрипционных факторов и продуктов их генов-мишеней (нейротрофического BDNF и анти-апоптического факторов Bcl-2) в механизмы повреждающей и адаптогенной гипоксии. Это дает более точное представление о внутриклеточных процессах, происходящих при гипоксических воздействиях различной интенсивности. Выявленные особенности экспрессии молекулярных факторов в ответ на действие различных режимов

гипобарической гипоксии, могут способствовать раскрытию и пониманию нейропротективных механизмов, лежащих в основе гипоксического preconditionирования, создаваемого умеренной, гипоксической гипоксией. Эти данные весьма важны, так могут лечь в основу разработки способов повышения резистентности мозга и организма в целом к экстремальным факторам среды и внедрения в медицинскую практику.

Отрицательные стороны работы. В общей сложности диссертация А.В. Чуриловой производит благоприятное впечатление. Вместе с тем, это не освобождает автора от некоторых замечаний.

1. В разделе «Научная новизна исследования» автор, на мой взгляд, излишне самонадеянно пишет: «В работе впервые охарактеризованы особенности повреждающего действия тяжелой гипобарической гипоксии, проявляющиеся в морфологических изменениях нейронов, а также в изменении содержания различных внутриклеточных факторов, регулирующих процессы гибели/выживания нейронов». Подобные данные (автор об этом хорошо знает, поскольку ссылается на них в работе), были неоднократно получены ранее и Вашим руководителем, и Е. А. Рыбниковой и др. сотрудниками лаборатории.
2. Не следует в разделах «Цели», «Задачи» и «Выводы» использовать необщепринятую аббревиатуру.
3. Названия таблиц 1 и 2 располагаются подобно подписям к рисункам – это неправильно.

Вопрос:

Исследовалась ли ткань мозга животных, погибших при ТГ после 3-х кратного preconditionирования гипобарической гипоксией (15%)? На Ваш взгляд, в чем причина гибели этих животных – в том, что им недостаточно было 3-х кратного preconditionирования или в низкой индивидуальной устойчивостью, возможно обусловленной генетическим полиморфизмом, вовлеченных в процесс адаптации генов, в том числе исследованных в Вашей работе.

Заключение

Диссертация Анны Викторовны Чуриловой, представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.03.01. – физиология, является квалификационной работой по решению актуальной научной проблемы в области молекулярно-клеточной физиологии адаптаций. Содержащиеся в работе материалы представляют собой совокупность новых научных достижений, имеющих важное теоретическое и прикладное значение. Многогранное рассмотрение решаемой проблемы, использование современных методов исследований, высокий уровень обобщения

полученного экспериментального материала позволяет утверждать, что в ходе выполнения исследований автор в полном объеме решил поставленные задачи.

Диссертация А.В. Чуриловой полностью удовлетворяет требованиям ВАК, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения искомой степени.

Доктор биологических наук,
старший научный сотрудник кафедры
общей физиологии биологического факультета
Санкт-Петербургского
государственного университета,
199034 Университетская наб. 7/9,
тел. (812)328-95-89,
e-mail: baranovati@gmail.com

Т.И. Баранова

