

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Чуриловой Анны Викторовны **«Исследование влияния различных режимов гипобарической гипоксии на экспрессию транскрипционных факторов и про-адаптивных белков в мозге крысы»**, представленную к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук в специализированный Диссертационный Совет Д 002.020.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук по специальности 03.03.01 – физиология.

Выбранная Анной Викторовной Чуриловой тема диссертационной работы, посвященная изучению экспрессии ряда транскрипционных факторов (активационных и лиганд-зависимых) при действии различных режимов гипобарической гипоксии, **представляется обоснованной и несомненно актуальной**, поскольку гипоксия является одним из основных компонентов патогенеза многих заболеваний и выяснение механизмов возникновения и поиск способов предотвращения действия патогенного гипоксического фактора является важной и актуальной задачей нейробиологии и медицины. Одним из эффективных подходов в решении данной проблемы является повышение устойчивости мозга к действию острой гипоксии за счет индукции внутриклеточных защитных механизмов, вызываемой повторяющейся умеренной гипоксией и названный феноменом preconditionирования (ПК). Однако, молекулярные механизмы preconditionирования пока не до конца ясны. Одним из малоизученных звеньев является участие в этих процессах транскрипционных факторов. Несомненно, что выяснение паттернов их экспрессии дополняет и расширяет понимание процессов, происходящих на молекулярном уровне при формировании толерантности нейронов мозга к гипоксии. Заслугой автора можно считать и то, что А.В. Чурилова провела также анализ экспрессии и продуктов генов-мишеней транскрипционных факторов - про-адаптивных белков, активация которых является важным этапом в реализации механизмов гипоксического preconditionирования.

Диссертация А.В. Чуриловой построена по классическому плану и состоит из Введения, Обзора литературы, глав с описанием Материалов и методов, Resultados исследований и их обсуждения, Заключение, Выводов и Списка литературы. Работа изложена на 155 страницах, иллюстрирована 58 рисунками и 2 таблицами. Список цитируемой литературы включает 427 источников.

Целью настоящей работы явилось исследование влияния различных режимов гипобарической гипоксии (повреждающей и протективной) на экспрессию активационных и лиганд-зависимых ТФ, вовлекаемых в процессы гибели/выживания нейронов, а также продуктов их генов-мишеней – про-адаптивных белков, в коре больших полушарий и

гиппокампе крыс. Необходимо сразу отметить, что поставленные задачи работы соответствуют цели исследования, а полученные данные отличаются научной новизной.

Во Введении обосновывается актуальность выбранного направления исследования, формулируются цель и задачи исследования, а также положения, выносимые на защиту, приводятся основные новые полученные экспериментальные данные, обосновывается их теоретическое и практическое значение. Приводятся основные поставленные задачи работы для достижения цели исследования.

Обзор литературы (39 стр., 4 рис.) достаточно полно отражает современное состояние проблемы и содержит несколько разделов, в которых описаны механизмы действия повреждающей гипоксии и способы прекондиционирующих воздействий. Особое внимание уделено анализу литературы, касающейся механизмов гипоксического прекондиционирования. В обзоре литературы подробно изложены современные представления о строении, функционировании и регуляции изученных транскрипционных факторов, а также характере их вовлечения в механизмы гибели или выживания нейронов. Отдельная часть посвящена роли про-адаптивных белков в механизмах нейропротекции. Литературный обзор читается с интересом, написан информативно хорошим понятным языком. Несколько портят впечатление опечатки и многочисленные сокращения, применяемые в работе неоправданно широко.

Глава «Материалы и методы» (8 стр., 4 рис.) содержит описание методов и подходов, использованных для решения поставленных задач, организации и условий проведения экспериментов. Достаточно подробно и понятно изложен материал о режимах гипобарической гипоксии с подробным описанием схемы эксперимента. Методы исследования, использованные в работе, современны и адекватны поставленным задачам. К ним относятся базисный морфологический метод окраски по Нисслю и иммуноцитохимический метод, который позволяет достаточно точно выявить содержание того или иного белка в клетке. Следует отметить, что в работе использован новый подход обработки микроизображений на основе компьютерной программы «Видеотест Мастер Морфология 5.2». Данная программа позволяет провести подсчет числа иммунопозитивных к определенному белку клеток, а также классифицировать эти клетки в зависимости от степени их иммунореактивности.

Глава «Результаты и их обсуждение» (57 стр., 50 рис.) разделена на два основных раздела: один — касается результатов морфологических данных, а второй — иммуноцитохимических исследований экспрессии активационных и лиганд-зависимых транскрипционных факторов, а также про-адаптивных белков при действии различных режимов гипобарической гипоксии. В каждом разделе описаны результаты собственного

исследования и приведено обсуждение этих результатов в свете современной научной литературы. Результаты исследований подробно иллюстрированы цветными рисунками. Работа выполнена на большом экспериментальном материале, полученные данные обработаны с применением адекватных методов количественного и статистического анализа, что делает их вполне достоверными. Однако, некоторые иллюстрации вызывают вопросы. Так на рисунках 9 и 10 трудно сопоставить микрофотографий коры при разных условиях. Может быть это следствие воздействия, тогда это нужно отметить и обсудить. Не слишком хорошего качества микрофотографии на рис. 9, 1б, есть отличие в фоне на рис. 36, 38, 42 и 50, что может сказаться на результатах оценки различий в иммунореактивности.

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. Показано, что тяжелая гипоксия (ТГ) приводит к глубоким структурным повреждениям нейронов корковых отделов мозга и вызывает в ранний период после воздействия (3-24 ч) подавление экспрессии активационных транскрипционных факторов, про-адаптивных белков, таких как нейротрофический фактор BDNF и антиапоптотический фактор Bcl-2, а также нарушение баланса содержания транскрипционных факторов глюко- и минералокортикоидных рецепторов. Впервые проведен сравнительный анализ действия двух различных режимов preconditionирования, однократного и трехкратного, отличающихся по их эффективности коррекции нарушений тяжелой гипоксии. Показано, что трехкратное preconditionирование предотвращает структурные повреждения нейронов, индуцированные ТГ, тогда как однократное preconditionирование не оказывает такого эффекта. Вместе с тем, выявлены специфические особенности экспрессии активационных и лиганд-зависимых транскрипционных факторов, а также про-адаптивных белков в ответ на однократное или трехкратное preconditionирование после ТГ. Обнаружено, что ТГ у однократно preconditionированных крыс имеет схожее действие с действием только одной ТГ или не оказывает эффекта на уровень экспрессии исследуемых молекулярных факторов, тогда как у трехкратно preconditionированных животных вслед за ТГ преимущественно увеличивается содержание этих факторов. Кроме того, установлено, что трехкратное preconditionирование также предотвращает нарушения регуляции гипоталамо-гипофизарно-адреналокортикальной системы, вызванные ТГ, связанные с особенностями экспрессии глюко- и минералокортикоидных рецепторов. В частности, ТГ приводит к нарушению баланса их содержания в зубчатой извилине и поле CA1

гиппокампа. Однократное ПК не предотвращает подавление экспрессии минералокортикоидных рецепторов, а трехкратное предотвращает снижение уровня минералокортикоидных рецепторов на фоне увеличения содержания глюкокортикоидных рецепторов в зубчатой извилине гиппокампа после ТГ, что важно для активации отрицательной обратной связи гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальной системы. Впервые установлено, что предъявление трех сеансов умеренной гипобарической гипоксии индуцирует кооперативную активацию исследуемых транскрипционных факторов и про-адаптивных белков, что имеет важное значение для формирования механизмов толерантности нейронов кортикальных отделов мозга к повреждающим воздействиям.

Полученные в настоящей работе результаты вносят существенный вклад в понимание общих неспецифических механизмов адаптации и повышения резистентности нейронов к действию неблагоприятных факторов, в том числе тяжелых форм гипоксии. Выявленные особенности экспрессии молекулярных факторов в ответ на действие различных режимов гипобарической гипоксии, могут способствовать раскрытию и пониманию нейропротективных механизмов, лежащих в основе прекондиционирования, создаваемого умеренной гипобарической гипоксией, и имеют большое **теоретическое значение**.

Практическая значимость работы определяется поиском новых немедикаментозных и эффективных способов повышения естественных ресурсов организма. Для дальнейшего применения прекондиционирования с помощью гипобарической гипоксии в клинической практике необходимо подобрать максимально эффективный режим, который при этом не имел повреждающего действия. Проведенный А.В. Чуриловой сравнительный анализ двух режимов прекондиционирования, один из которых наиболее эффективен для коррекции повреждающего действия ТГ, имеет большое **практическое значение**. На основании полученных в настоящем исследовании данных, выявлено, что для развития полноценного нейропротективного эффекта необходимо предъявление нескольких сеансов прекондиционирования, тогда как одного сеанса недостаточно для индукции гипоксической толерантности и предотвращения повреждений нейронов мозга при действии ТГ.

В «Заключении» диссертации все полученные данные обобщаются при помощи таблиц, что наглядно демонстрирует общие принципы экспрессии исследуемых молекулярных факторов при действии различных режимов гипобарической гипоксии. В сжатой форме дается интерпретация полученных данных. Этот раздел диссертации логично подводит к выводам.

Шесть выводов соответствуют полученным результатам, хорошо обоснованы и отражают суть положений, выносимых на защиту. Однако, читать некоторые выводы трудно из-за многочисленных сокращений. Хотелось также обсудить, в качестве дискуссии, в чем суть сакраментального числа 3 для получения эффективной преколонии к условиям тяжелой гипоксии и можно ли выделить главное звено из полученных данных, которое является ключевым и приводит к повышению толерантности мозга после преколонирования.

Основные результаты диссертационного исследования Чуриловой А.В. опубликованы и обсуждались на конференциях и симпозиумах Международного и Российского уровня. По теме диссертации опубликовано 8 научных печатных работ в российских и зарубежных журналах, рекомендованных ВАК РФ, а также 9 тезисов докладов. Автореферат полностью отражает основное содержание диссертации.

Заключение. Принимая во внимание актуальность выполненной работы, обоснованность и научную новизну полученных данных, объективность основных положений и выводов, а также их существенную теоретическую и практическую значимость, можно заключить, что диссертация А.В. Чуриловой на тему: **«Исследование влияния различных режимов гипобарической гипоксии на экспрессию транскрипционных факторов и про-адаптивных белков в мозге крыс»** является законченным, самостоятельно выполненным научно-исследовательским трудом. Диссертационная работа соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание степени кандидата биологических наук (п. 8 Положения о порядке присуждения ученых степеней, Постановление Правительства РФ от 20.06.2011 № 475), а ее автор Чурилова Анна Викторовна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.01 – «физиология».

Зав. лабораторией сравнительной физиологии
и патологии центральной нервной системы
Федерального государственного бюджетного
учреждения науки Института эволюционной
физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова
Российской академии наук,
доктор биологических наук,
специальность 03.03.01 - физиология
адрес: ИЭФБ РАН, пр. Тореза, 44,
Санкт-Петербург, РФ,
Раб. Тел. +7812 5523166,
E-mail: zhuravin@iephb.ru

И.А. Журавин

