

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук Рыбниковой Елены Александровны 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 темы исследования. Диссертационное исследование Сахарновой Т.А. посвящено изучению эффектов нейротрофического фактора головного мозга (BDNF) на выживаемость и функционирование нейронов гиппокампа мышей в условиях гипоксии *in vitro* и *in vivo*. Согласно данным ВОЗ, патологические последствия повреждающих форм гипоксии/ишемии являются ведущими факторами патогенеза многих неврологических заболеваний, включая болезнь Альцгеймера, поэтому очевидна необходимость поиска путей повышения устойчивости мозга к факторам гипоксической природы. Одним из подходов к решению этой задачи является разработка новых лекарственных средств, направленных на активацию эндогенных нейропротективных механизмов. В этом отношении большой интерес для исследователей на современном этапе представляет нейротрофин BDNF, играющий важную роль в развитии и функционировании нейронов мозга, их выживаемости, процессах нейропластичности. В работах последних лет убедительно продемонстрирован нейропротективный эффект BDNF в условиях ишемии, эксайтотоксичности, действия стрессорных факторов, а также активация экспрессии данного нейротрофина в мозге при формировании гипоксической\ишемической толерантности с применением немедикаментозных способов пре- и посткондиционирования. Все это позволяет рассматривать BDNF в качестве перспективной мишени для разработки новых терапевтических стратегий и диктует необходимость

детального изучения его эффектов и механизмов действия в различных экспериментальных парадигмах. В связи с этим, тему диссертационного исследования Сахарновой Т.А. следует признать актуальной.

Основываясь на немногочисленных данных литературы о влиянии экзогенного BDNF на устойчивость уязвимых нейронов мозга к гипоксии, Сахарнова Т.А. поставила целью своей работы изучить эффект BDNF на биоэлектрическую активность нейронных сетей в культуре клеток гиппокампа, а также его нейропротективные свойства при моделировании гипоксии *in vitro* и *in vivo*. Цель сформулирована четко и понятно. В соответствии с объявленной целью поставлено 3 последовательных задачи, каждая из которых относится к отдельному целостному фрагменту исследования – изучению нейротропного действия BDNF на биоэлектрическую активность в динамике формирования нейронных сетей *in vitro*, исследованию протективного действия BDNF на биоэлектрическую активность в условиях нормобарической гипоксии, и, наконец, оценке влияния BDNF на устойчивость мышечной ткани к острой гипобарической гипоксии *in vivo* по анализу выживаемости и поведения. Следует признать, что столь детальное и разностороннее исследование нейротропных и нейропротективных эффектов BDNF, в частности при гипоксии, проводимое параллельно *in vitro* и *in vivo*, весьма целесообразно.

Научная новизна. В работе получены новые сведения о нейротропных и нейропротективных эффектах нейротрофина BDNF. Впервые проанализировано его влияние на спонтанную биоэлектрическую активность нейронов первичных культур гиппокампа на разных стадиях формирования нейронных сетей и показано, что BDNF оказывает дозо-зависимый нейротропный эффект только на зрелые нейронные сети. Выявлен ранее неизвестный аспект нейропротективного действия BDNF *in vitro*, заключающийся в сохранении спонтанной сетевой активности нейронов первичных культур гиппокампа при нормобарической гипоксии. Кроме того, впервые обнаружено, что при интраназальном введении мышам нейротрофин

BDNF существенно (на 40%) повышает устойчивость животных к острой гипобарической гипоксии и предотвращает нарушения поведения, обучения и памяти в постгипоксический период. Эти новые данные хорошо согласуются с уже имеющимися в литературе сведениями о протективных эффектах BDNF и подтверждают предположение о том, что BDNF и его рецепторы (TrkB) представляют собой перспективную мишень для терапевтических воздействий.

Теоретическая и практическая значимость работы определяется полученными фундаментальными сведениями об эффектах нейротрофина BDNF на активность нейронов и структурно-функциональную резистентность к гипоксии. Результаты работы расширяют современные представления об этих процессах, послужат основой для дальнейшего изучения механизмов, реализующих эти эффекты. В практическом отношении ценность полученных данных заключается в том, что они могут быть использованы при разработке и сравнительном тестировании препаратов BDNF-миметического действия.

Достоверность и обоснованность положений и выводов диссертации. Экспериментальные данные, приведенные в диссертации Т.А. Сахарновой, получены на достаточном экспериментальном материале, адекватными и оригинальными методами исследования, грамотно статистически обработаны. На основании полученных данных сделано 6 обоснованных выводов. При детальном знакомстве с рукописью достоверность представленных в работе материалов не вызывает сомнений.

Структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 140 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы (Глава 1), описания материалов и методов исследования (Глава 2), изложения собственных результатов и их обсуждения (глава 3), за которым следует заключение, выводы и список цитируемой литературы, содержащий 192 источника. Работа иллюстрирована 28 рисунками и 4 таблицами.

В первой главе «Обзор литературы» приведены сведения о строении и регуляции гена и белка нейротрофина BDNF, эффектах на нервную систему и молекулярно-клеточных механизмах его действия. Наряду с этим вводится понятие о гипоксии и рассматриваются существующие модели гипоксии/ишемии *in vitro* и *in vivo*. Обзор литературы заканчивается главой о нейросетевом подходе в изучении деятельности мозга и логичным переходом к методам и результатам собственного исследования.

Во второй главе «Материалы и методы исследования» изложены общая характеристика объектов исследования, а также использованные в работе методы *in vitro* и *in vivo*, включая создание нормобарической и гипобарической гипоксии. Основу использованного в диссертации оригинального методического подхода *in vitro* составляет совмещение двух ультрасовременных методов, не уступающих мировому уровню – первичной культуры диссоциированных клеток гиппокампа и мультиэлектродной системы регистрации активности нейронов. Каждый из этих методов достаточно сложен, зато их комбинация путем культивирования клеток гиппокампа на мультиэлектродной матрице позволила оценить эффекты BDNF на активность нейронов и их реакции на гипоксию в хроническом опыте, моделирующем динамику развития нейронных сетей в онтогенезе. Безусловным достоинством работы является параллельное изучение эффектов BDNF на процессы нейропластичности при гипоксии *in vitro* и выживание, обучение и память – *in vivo*, при гипобарической гипоксии, имитируемой в барокамере. Адекватными следует признать и методы математической статистики, использованные для статистической обработки результатов, хотя применение post-hoc критериев было бы желательно, особенно при дисперсионном анализе. Таким образом, очевидно, что диссертационное исследование выполнено на хорошем уровне с привлечением разнообразных, сложных и современных методов исследования. Комбинация использованных в работе методов и подходов полностью соответствует целям и задачам исследования.

Третья глава содержит описание полученных результатов и их обсуждение. Экспериментальный материал представлен достаточно подробно и хорошо проиллюстрирован наглядными рисунками и таблицами. Однако для понимания процессов, происходящих в динамике развития нейронных сетей, и их сопоставления с описываемыми изменениями биоэлектрической активности читателю не хватает сведений о морфофункциональных закономерностях развития данных культур. Они фрагментарно разбросаны по всему тексту диссертации, вскользь цитируются литературные источники (в частности, Широкова с соавт., 2013), однако целесообразно было бы представить современные знания по этому вопросу более детально и систематизированно, возможно в виде отдельной главы в обзоре литературы или методах.

Полученные данные обсуждаются автором в свете современных представлений о протективных эффектах и механизмах BDNF, его участия в процессах нейропластичности и нейропротекции. Завершается диссертационная работа Заключением, где в лаконичной форме обобщены проведенные исследования, полученные результаты и обоснованы сделанные выводы.

Диссертация оформлена в соответствии с требованиями ВАК РФ, написана хорошим научным языком, построение работы традиционное.

Освещение диссертации в научной печати. Данные диссертационного исследования Сахарновой Т.А. широко обсуждались на международных и Всероссийских конференциях. Они полностью опубликованы в открытой печати в рамках 27 работ, из которых 8 статей в рецензируемых журналах, входящих в список ВАК РФ.

Анализ содержания автореферата показывает, что он соответствует содержанию диссертации и полностью отображает ее теоретические и практические положения.

В качестве замечаний и вопросов по диссертации необходимо отметить следующее:

1. На основании проведенных исследований Сахарнова Т.А. констатирует у BDNF антигипоксические свойства, что представляется не вполне корректным, поскольку автором не доказана специфика описанных эффектов BDNF по отношению к механизмам гипоксии и ее компенсации. На наш взгляд, фактически описан нейропротективный эффект аппликации BDNF в условиях гипоксии, и подобная формулировка представляется более корректной. Либо возникает вопрос – в чем автор видит отличие описанных ею антигипоксических свойств BDNF от его известного неспецифического нейропротективного действия? Утверждение о том, что BDNF «является компонентом эндогенной антигипоксической системы защиты клеток мозга» (см. Положение на защиту-2) выглядит умозрительным и не подкрепленным собственными экспериментальными данными диссертанта.

2. Недостаточное внимание диссертанта к изучению механизмов, реализующих описанные эффекты экзогенного BDNF, что является недостатком работы. Интересно было бы оценить вклад транскрипционного фактора CREB, киназ, факторов регуляции апоптоза и прочих внутриклеточных мишеней BDNF, вовлечение которых можно предполагать исходя из современных представлений. Вероятно, раскрытие механизмов описанных эффектов BDNF составит предмет дальнейших исследований автора.

3. При проведении экспериментов *in vivo* интраназальная инъекция BDNF осуществлялась за 40 мин до начала «подъема» в барокамере. Почему был выбран данный срок? Известно, что белок BDNF является довольно нестабильной молекулой и время его полужизни не превышает 10 мин.

4. В первом выводе говорится о том, что BDNF оказывает действие только на зрелых культурах, однако при описании результатов экспериментов (глава 3.1.1.) приводятся полученные в работе данные о том, что аппликация даже низких доз BDNF (0.1 нг/мл, 1 нг/мл) стойко влияла на перераспределение паттерна активации нейронов в раннем периоде развития

нейронных сетей (7 DIV), что наглядно проиллюстрировано рисунком 9. Почему этот интересный факт не нашел отражения в выводах?

Заключение. Принимая во внимание актуальность выполненной работы, ее научную новизну, обоснованность выводов, а также их существенную теоретическую и практическую значимость, можно заключить, что диссертация Сахарновой Татьяны Александровны на тему «Нейротропное и антигипоксическое действие нейротрофического фактора головного мозга (BDNF) *in vivo* и *in vitro*», соответствует требованиям п. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» (Постановление Правительства Российской Федерации РФ от 24 сентября 2013 г. N 842 г.), предъявляемым к кандидатской диссертациям, а ее автор достойна присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.01 – физиология.

Официальный оппонент

Доктор биологических наук,

главный научный сотрудник

лаборатории нейроэндокринологии

Федерального государственного бюджетного

учреждения науки «Институт физиологии им. И.П. Павлова»

Российской академии наук



Рыбникова Елена Александровна

Подпись доктора биологических наук Рыбниковой Е.А. заверяю

Зав.канцелярией ФГБУН «Институт физиологии им. И.П. Павлова» РАН

Андреева Елена Анатольевна

Адрес: 199034, г. Санкт-Петербург, наб. Макарова, д.6, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт физиологии им. И.П. Павлова» Российской академии наук; тел.: 8(813)7072850; e-mail: rybnikova1@rambler.ru



Рыбниковой Елене Александровне
Андреева Елена Анатольевна

«_04_» февраля 2015 г.