

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию

Першиной Екатерины Викторовны

на тему: "РОЛЬ МЕТАБОТРОПНЫХ РЕЦЕПТОРОВ ГЛУТАМАТА В НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ПОВРЕЖДЕНИЯХ ГИППОКАМПА, ВЫЗВАННЫХ НЕЙРОТОКСИНАМИ",

представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.01 – "Физиология".

Актуальность темы. Механизмы нейродегенерации различной этиологии включают в себя ряд событий, среди которых можно выделить окислительный стресс, митохондриальные дисфункции и воспаление нейрональной ткани. В свою очередь, среди этих механизмов выделяется глутаматная токсичность, связанная с наличием избыточной концентрации внеклеточного глутамата и чрезмерной активацией его рецепторов. Существует несколько направлений в разработке нейропротективных средств, включающих блокирование потока Ca^{2+} в нейроны, ингибирование НМДА-подтипа глутаматных рецепторы, активацию путей захвата глутамата из внеклеточного пространства и др. Однако до настоящего времени не найдено эффективного средства, применимого в клинической практике, что указывает на актуальность дальнейшего исследования фундаментальных механизмов нейродегенеративных явлений. Тема диссертации Е.В. Першиной находится в русле таких исследований и посвящена выяснению роли метаботропных рецепторов глутамата в нейродегенеративном повреждении гиппокампа.

Новизна исследования и полученных результатов. В диссертации подробно исследована экспрессия генов глутаматных рецепторов в гиппокампе в разные сроки после его нейротоксического повреждения. Было впервые показано вовлечение различных типов этих рецепторов в адаптивные/компенсаторные механизмы, индуцированные каинатом и хлоридом триметилолова (ТМТ). Полученные данные указывают на особое значение некоторых подтипов (3-5) глутаматных рецепторов в этих механизмах, экспрессия которых закономерно изменялась по мере развития нейродегенерации, вызванной нейротоксинами. Кроме того, на основании оценки уровней мРНК для подтипов 3 и 4 и маркера воспаления, COX-2, Е.В. Першиной были впервые определены конкретные сроки периода нейровоспаления в механизмах действия ТМТ. Была показана также реципрокная зависимость между активностью метаботропных глутаматных рецепторов типа 4 и экспрессией их генов. Полученные данные закладывают основы для определения направленности фармакологической коррекции патологических изменений при повреждающих воздействиях. Для снижения уровня гибели гиппокампальных нейронов, вызванной каинатом, впервые было применено

совместное воздействие на пре- и пост-синаптические глутаматные рецепторы. Такая фармакологическая модуляция активности этих рецепторов позволила остановить/замедлить гибель клеток в гиппокампе. Е.В. Першиной было впервые продемонстрировано возвращение к норме и уровней экспрессии генов разных подтипов глутаматных рецепторов, измененных под влиянием каината.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. Результаты, полученные диссертантом, основаны на применении современных научных методов. В работе сделан глубокий анализ данных и теоретических положений других авторов по теме исследования. Обоснованность результатов, полученных Е.В. Першиной, основана на соответствии цели работы, поставленных задач, полученных результатов и сформулированных выводов.

Достоверность результатов и выводов. Высокая степень надёжности материала исследования определяется достаточным объемом данных, полученных с использованием соответствующих задачам и апробированных методов. Достоверность результатов подтверждена применением адекватных статистических методов для анализа этих данных.

Теоретическая и практическая значимость. Результаты, представленные в диссертации, дали возможность Е.В. Першиной показать особую роль тех подтипов глутаматных рецепторов, которые в наибольшей степени вовлечены в механизмы нейродегенерации, что позволяет выбрать среди этих рецепторов мишени для нейропротекции и предложить фармакологический способ модуляции их активности на разных этапах нейродегенерации. По мнению диссертанта, на ранних стадиях этого процесса, вызванного ТМТ-интоксикацией, для снижения гибели нейронов можно применять лиганды, последовательно активирующие глутаматные рецепторы подтипа 4 и 3, а на поздних этапах - ингибирующие рецепторы подтипа 5. Крайне интересны результаты, уточняющие способ применения фармакологических агентов при известных сдвигах в уровне экспрессии генов в мозге, а также выявленные реципрокные отношения между активностью рецептора подтипа 4 и уровнем его мРНК. Важный теоретический аспект представляет предположение автора, что для поддержания компенсаторно-восстановительных механизмов, индуцированных повреждающим фактором, фармакологическое воздействие должно быть направлено на нормализацию уровня экспрессии соответствующего гена. Кроме того, существенное практическое значение может иметь предложенный диссертантом и проверенный на каинатной модели вариант совместного применения лигандов к пре- и пост-синаптическим подтипам глутаматных рецепторов. Такой подход позволит существенно снизить дозы фармакологических агентов и продолжительность их применения.

Структура и объем работы. Диссертация Е.В. Першиной оформлена традиционно и содержит разделы: "Введение", "Обзор литературы", "Материалы и методы

исследования”, “Результаты”, “Обсуждение результатов”, “Заключение”, “Выводы”, “Список сокращений” и “Список литературы”. Работа изложена на 116 страницах, содержит 38 рисунков и 4 таблицы. Список литературы включает 249 наименований.

Оценка содержания диссертационной работы. Название диссертации отражает ее содержание. Автореферат отражает основное содержание диссертации. Во “Введении” традиционно излагаются общие вопросы: актуальность научной проблемы, цель и задачи исследования, научная новизна, научно-практическая значимость работы; логично вытекающие из предыдущего текста положения, выносимые на защиту; приводятся данные по апробации, а также по структуре и объему диссертации. Глава “Обзор литературы” включает детальный анализ работ, посвященных глутамату и подтипам его рецепторам, а также описанию некоторых моделей для исследования нейродегенеративных явлений в мозге. В главе “Материалы и методы исследования” достаточно подробно описываются методы, используемые диссертантом в своей работе. Глава “Результаты” содержит данные, полученные диссертантом при исследовании моделей нейродегенерации с применением каината и хлорида триметилолова. По мере изложения полученных данных делалось краткое, но крайне полезное, их обсуждение, с расширенным и достаточно полным вариантом в Главе 4.

Замечания к работе

Содержание диссертационной работы Е.В. Першиной и формат его представления не находят основания для их серьёзной критики. В оформлении текста диссертации использован литературный русский язык, а её содержание представлено в логичной последовательности. Всё это существенно облегчает восприятие и понимание не только основных идей, развиваемых автором, но и тех особенностей, вытекающих из полученных результатов, которые могут составить перспективу дальнейших исследований.

Тем не менее, следует отметить несколько моментов, которые порой нарушают плавный ход восприятия представляемой автором информации. Ниже приводятся некоторые примеры из них.

По содержанию:

Отсутствует обоснование выбора двух поведенческих тестов для анализа обучения животных.

В Выводе 4 более логично сначала указать полученный конкретный факт, а затем высказать обобщающее предположение, но не наоборот.

Стиль (выделено подчёркиванием):

Стр. 6 - “Еще одна работа, где проведено детальное исследование действия каината на гиппокамп мышей, проведено в работе....”

Стр. 42 - “....процессы, вызванные экспериментально вызванной ишемией мозга.”

Стр. 42 - "Они способны снижать уровень возбуждения, и потому они могут быть эффективными нейропротекторами в условиях эксайтотоксичности."

Стр. 43 - "...важнейшей причиной такой ситуации, является важная роль..."

Стр. 46 - "У крыс после микроинъекции каиновой кислоты наблюдали лимбические судороги, которые продолжались менее трех часов и не наблюдались (животные с проявлением судорожной активности для поведенческих экспериментов не использовались)"

Стр. 55 - Чередование изложения текста от 1-го и 3-го лица

Стр. 57 - "Нейроны.... имели набухание цитоплазмы, ее вакуолизацию, потерю целостности мембраны..."

Стр. 58 - "... побежки совершались со временем менее 5 секунд."

Стр. 63 - - "Целевая полка №2 на этой стадии эксперимента уже не подкреплялась" -

Стр. 63 - "...чем контрольной группы" Лучше так - "...чем у животных из контрольной группы"

Стр. 65 - "...реакцию замерзания" (нужно взять в кавычки)

Стр. 66 - - "Нейроны имели дегенеративных изменений:..."

Стр. 77 - "Токсины изначально действуют на разные мишени и первичные механизмы разные."

Стр. 81 - "Обзор (Bruno et al., 2017)...." - желательно: "Обзор Бруно с коллегами (2017)...."

Технические аспекты:

Стр. 46 - нет ссылки на используемый атлас мозга крыс

Стр. 48 - не указан источник LY354740

Стр. 79 - "Делеция гена мГлу5и снижала концентрацию Аβ-олигомера" (нет ссылки)

Стр. 82 - "Данные подтвердились.....на моделях болезней Альцгеймера и Паркинсона на крысах" (нет ссылки)

Стр. 47 - Животным, обученным до достижения критерия....(нужно либо описать тест, либо указать, что это будет сделано ниже, в соответствующем разделе, либо поменять порядок разделов 2.2 и 2.3)

Стр. 57 - "...через 3 дня (Гр. 1) или 6 дней (Гр. 2)..." (нет расшифровки!)

Стр. 60 - Рис. 22 (Б - Д) - отсутствует масштаб

Стр. 63 - в подписи к Рис. 24 (или в тексте) желательно указать абсолютный исходный вес в обеих группах животных

Стр. 66 - Рис. 28 - практически не виден масштаб!

Стр. 68 - в подписи к Рис. 30 нужно указать, что на всех срезах масштаб 50 мкм, как на В, либо везде это сделать.

На рисунках с гистологическими срезами не указаны (например, стрелками) области, где наблюдается описываемые эффекты.

Рис. 4 - AMPA vs. AMPA ? – унифицировать!

- Рис. 6 - “ с семью трансмембранным участком”
- Рис. 6 - нокаютированы
- Стр. 34 - нейротоксиканотом
- Стр. 41 - подаылять
- Стр. 46 -нембута 20 мг/кг...
- Стр. 50 - “ состояла и последовательных,...”
- Стр. 57 - (Рис.20 Д, Г)
- Стр. 58 - “Группы 2” - лучше унифицировать Гр. 2
- Стр. 61 - (Рисунок 23) - лучше унифицировать (Рис. 23)
- Стр. 61 - границы текста не отформатированы
- Стр. 63 - “... была сходжа,...”
- Стр. 63 - (Рис. 25-А), а должно быть (Рис. 25, А)
- Стр. 70 - (рис. 33), должно быть (Рис. 33)
- Стр. 71 - мГлу 4 должно быть мГлу4
- Стр. 76 - (Рис.38) - отсутствие пробела встречается довольно часто в тексте!

Заключение

Диссертация Першиной Екатерины Викторовны “РОЛЬ МЕТАБОТРОПНЫХ РЕЦЕПТОРОВ ГЛУТАМАТА В НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ПОВРЕЖДЕНИЯХ ГИППОКАМПА, ВЫЗВАННЫХ НЕЙРОТОКСИНАМИ”, представляет собой законченное исследование, основанное на привлечении достаточного фактического материала, собранного с высокой долей личного участия. Считаю, что диссертационная работа полностью соответствует требованиям п. 9 Постановления Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842 “О порядке присуждения ученых степеней”, а её автор, Першина Екатерина Викторовна заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.01 - “Физиология”.

*Доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник
Лаборатории клеточных механизмов патологии памяти
Института биофизики клетки Российской академии наук -
обособленного подразделения Федерального государственного
бюджетного учреждения науки “Федеральный исследовательский
центр “Пущинский научный центр биологических исследований
Российской академии наук””*

В. В. Воробьев

12 ноября 2019 г.



Подпись
В. В. Воробьева
Удостоверяю *зав. науч.*

Воробьев Василий Васильевич

Доктор биологических наук (05.13.09 - "Управление в биологических и медицинских системах (включая применение вычислительной техники)")

Ведущий научный сотрудник Лаборатории клеточных механизмов патологии памяти. Института биофизики клетки Российской академии наук обособленного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки "Федеральный исследовательский центр "Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук"

Контактные данные: тел.: (4967) 73-94-42, e-mail: vorobyovv2@gmail.com

Адрес места работы: Россия, 142290, г. Пушкино, Московская область, ул. Институтская, 3

Телефон: (4967) 73-05-19; Факс: (4967) 33-05-09; e-mail: admin@icb.psn.ru

Список основных публикаций официального оппонента по теме диссертационного исследования Е.В. Першиной за последние 5 лет:

Vorobyov V, Bakharev B, Medvinskaya N, Nesterova I, Samokhin A, Deev A, Tatarnikova O, Ustyugov AA, Sengpiel F, Bobkova N. Loss of Midbrain Dopamine Neurons and Altered Apomorphine EEG Effects in the 5xFAD Mouse Model of Alzheimer's Disease. J Alzheimers Dis. 2019; 70(1): 241-256.

Filippov MA, **Vorobyov VV**. Detrimental and synergistic role of epilepsy – Alzheimer's disease risk factors. Neural Regen Res 2019; 14(8): 1376-1377.

Nekrasov PV, **Vorobyov VV**. Dopaminergic mediation in the brain aging and neurodegenerative diseases: a role of senescent cells. Neural Regen Res. 2018; 13(4): 649-650.

Gordon R, Podolski I, Makarova E, Deev A, Mugantseva E, Khutsyan S, Sengpiel F, Murashev A, **Vorobyov V**. Intrahippocampal pathways involved in learning/memory mechanisms are affected by intracerebral Infusions of amyloid- β 25-35 peptide and hydrated fullerene C60 in rats. J Alzheimers Dis. 2017; 58: 711-724.

Vorobyov V, Bobkova N. Intracerebral interplay and neurotransmitter systems involvement in animal models of neurodegenerative disorders: EEG approach expectations. Neural Regen Res. 2017; 12(1): 66-67.

Bobkova N, **Vorobyov V**, Medvinskaya N, Nesterova I, Tatarnikova O, Nekrasov P, Samokhin A, Deev A, Sengpiel F, Korojev D, Volpina O. Immunization against specific fragments of neurotrophin p75 receptor protects forebrain cholinergic neurons in the olfactory bulbectomized mice. J Alzheimer's Dis. 2016; 53(1): 289-301.

Bobkova N, **Vorobyov V**. The brain compensatory mechanisms and Alzheimer's disease progression: a new protective strategy. Neural Regen Res. 2015; 10(5): 696-697.

Vorobyov V, Kaptsov V, Gordon R, Makarova E, Podolski I, Sengpiel F. Neuroprotective effects of hydrated fullerene c60: cortical and hippocampal EEG interplay in an amyloid-infused rat model of Alzheimer's disease. J Alzheimer's Dis. 2015; 45(1): 217-233.