

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Семёновой Алины Асатовны на тему: «Влияние глиального нейротрофического фактора (GDNF) на поведение и серотониновую систему мозга мышей с генетической предрасположенностью к патологическому поведению» на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.01 - физиология.

Работа Семёновой Алины Асатовны связана с изучением роли одного из нейротрофических факторов, а именно, - глиального нейротрофического фактора, в патогенезе и купировании патологических форм поведения, в качестве которых автором выбраны каталепсия и депрессивноподобное поведение. Вообще, исследование нейротрофических факторов в настоящее время очень популярно, в частности, в PubMed хранится более 2500 записей с тегом «GDNF», опубликованных за последние 10 лет, а более исследованный BDNF (и выделенный на 10 лет раньше) встречается более чем в 11000 публикаций. Это обусловлено всплеском работ, которые посвящены изучению нейродегенеративных процессов, а интерес к нейродегенерации растет в связи с тем, что современные медико-диагностические технологии позволяют выявлять нейродегенерацию разных стадий. Поскольку проблема описана практикующими врачами, наступил черед медико-биологов, исследователей-нейрофизиологов и, соответственно, пришла пора экспериментальных работ на животных, цель которых – максимально полно изучить явление нейродегенерации, выявить легко детектируемые маркеры и потенциальные фармакологические подходы к купированию нейродегенеративных процессов. Нейродегенеративные процессы в головном мозге приводят к формированию патологических форм поведения. Речь идет, в первую очередь, о проявлениях болезни Альцгеймера и болезни Паркинсона, не столь на слуху роль нейродегенеративных явлений в патогенезе депрессий, хотя показана связь депрессивноподобного поведения с развитием нейродегенеративных изменений в мозге (например, в работе Chung et al., 2015). И тематика работы Алины Асатовны очень остра и актуальна именно в настоящее время, когда работа выполнена на гребне научной волны в весьма популярном направлении и, о чем стоит сказать сразу, на современном методическом уровне.

Цель работы – исследование влияния однократного центрального введения GDNF на поведение животных и экспрессию ключевых серотониновой системы мозга у мышей каталептической линии ASC, которая также характеризуется депрессивноподобным поведением, и каталептической «недепрессивной» линии мышей CBA – нова и оригинальна,

поскольку изначально была исследована роль GDNF в развитии и функционировании дофаминергических нейронов (что к текущему моменту прекрасно описано в литературе), а серотонергическая система осталась в стороне, хотя взаимосвязь между дофаминовой и серотониновой системами давно известна. Цель вполне логична, сформулирована четко и ясно. Две поставленные автором задачи соответствуют цели.

Работа выполнена на оригинальных моделях: использованы мыши, демонстрирующие высокую предрасположенность к реакции замирания (каталепсии) двух линий: CBA/Lac и ASC; на современном методическом уровне: с применением автоматической системы регистрации поведения, с использованием метода ОТ-ПЦР для определения уровня экспрессии генов.

Достоверность полученных Алиной Асатовной результатов не вызывает сомнений, результаты описаны развернуто и полноценно. Научная новизна работы обусловлена исключительной новизной цели исследования, все полученные данные, несомненно, получены впервые. Работа подтверждает существование взаимного влияния GDNF и серотонергической системы, а также выявляет генотип-зависимость влияния GDNF на поведение и серотониновую систему мозга. Положения, выносимые на защиту, вполне обоснованы. Выводы соответствуют поставленным задачам.

Рукопись диссертации построена по общепринятому плану и состоит из введения, обзора литературы, отражающего современное состояние исследуемой проблемы, описания материалов и методов исследования, описания полученных результатов, обсуждения результатов и списка цитируемой литературы, содержащего 216 источников. Работа изложена на 98 страницах, содержит 16 рисунков и 8 таблиц. Также в Приложении представлены 3 обобщающие таблицы и 6 обобщающих рисунков. Автореферат соответствует содержанию диссертационной работы.

Материал, вошедший в диссертацию, опубликован в виде трех статей в рецензируемых журналах и обсужден на четырех конференциях.

Рукопись диссертации выполнена добротнo, имеется лишь незначительная для понимания сути работы небрежность оформления (опечатки, неудачные формулировки).

Обзор литературы посвящен анализу функций глиального нейротрофического фактора GDNF, в том числе Алина Асатовна проанализировала влияние GDNF на нейромедиаторные системы мозга (из которых наиболее исследована дофаминергическая система), поведение и память. Проведенная работа с литературой вполне логично подводит фундамент для исследования, проведенного автором. Следует заметить, что обзор литературы

весьма подробный, автор цитирует как зарубежные, так и отечественные публикации, а также широко цитирует работы коллег по лаборатории, в которой выполнена работа.

Материалы и методы описаны детально, но при прочтении возникли следующие вопросы:

- Животным вводили человеческий GDNF, а не мышинный, хотя аминокислотные последовательности человеческого и мышинного белка различаются. Может ли это сказаться на полученных результатах?
- Если животных рассаживали по одному за два дня до тестирования, а умерщвляли на 22-25 день после введения GDNF, то накладывается ли на поведение животных эффект социальной изоляции?
- Из авторского изложения непонятно, все ли животные были проведены через всю батарею тестов или нет? И если нет, то по какому принципу животных разбивали на группы для тестирования и по сколько тестов проходило каждое животное?
- Проверяли ли целостность экстрагированной РНК?
- Праймеры для ПЦР подобраны на основании данных литературы или самостоятельно с использованием компьютерной программы?
- В разделе «Статистическая обработка» не указано использованное программное обеспечение. Какой пакет программ применяли?

Результаты исследования изложены логично: проведен анализ влияния центрального введения GDNF на поведение мышей двух исследованных линий CBA и ASC по отдельности и в сравнении, затем описано влияние GDNF на функциональную активность серотониновых рецепторов 1A и 2A подтипов у мышей CBA и ACS и, наконец, оценен эффект GDNF на экспрессию генов, вовлеченных в регуляцию активности серотониновой системы мозга у мышей ASC и CBA также по отдельности и в сравнении. По анализу и изложению результатов возник вопрос:

- На каком основании автор проводит однофакторный дисперсионный анализ по отдельности для животных каждой линии? Представляется более логичным проведение двухфакторного анализа (факторы: линия, воздействие), и на основании наличия/отсутствия взаимодействия факторов либо проводить, либо не проводить однофакторный анализ.

Обсуждение полученных результатов изложено в той же последовательности, что и собственно результаты. Данные, полученные в представленной работе, автор сопоставляет с данными других авторов, создавая целостную картину возможной роли GDNF в функционировании серотониновой системы мозга мышей во взаимосвязи с поведением

животных. В результате обсуждения проясняется генотип-зависимое влияние экзогенного GDNF на обучение, каталепсию, навязчивые состояния, тревожное поведение, депрессивноподобное поведение у мышей. Параллельно автором выявляется генотип-зависимость действия GDNF на экспрессию генов *Tph2*, *Htr1a* и *Htr2a* в различных отделах мозга исследованных животных. И поскольку GDNF вызывает изменения и в поведении, и в центральной серотониновой системе, вполне обоснована попытка Алины Асатовны связать между собой все полученные данные. На основании обсуждения сделано обобщающее заключение. В то же время обсуждение оставляет открытыми ряд вопросов:

- Согласно данным Науменко с соавторами (Науменко и др., 2010) у мышей линии ASC с генетически детерминированной предрасположенностью к каталепсии снижена экспрессия гена *Htr2a* и снижена же функциональная активность 5-HT_{2A} рецепторов по сравнению с мышами, не демонстрирующими предрасположенности к каталепсии. В настоящей работе функциональная активность 5-HT_{2A} рецепторов под влиянием GDNF не изменяется (т.е. остается сниженной) при активации экспрессии гена *Htr2a* во фронтальной коре. Алина Асатовна трактует собственные данные в пользу антикаталептического эффекта GDNF у мышей ASC: «...значительно возросла экспрессия гена 5-HT_{2A} рецептора во фронтальной коре, что может объяснить антикаталептический эффект GDNF...») – какой механизм подразумевает автор, учитывая неизменную функциональную активность рецептора?
- Аналогичный вопрос возникает и при толковании Алиной Асатовной данных, касающихся экспрессии гена *Htr1a* и функциональной активности 5-HT_{1A} рецепторов: каким образом снижение уровня экспрессии гена *Htr1a* в гиппокампе при неизменной функциональной активности (которая согласно данным Науменко с соавторами (Науменко и др., 2006) увеличена у мышей ASC, предрасположенным к каталепсии) опосредует анксиолитический и продепрессивный эффект GDNF у мышей ASC?

Наконец, выводы. Они соответствуют поставленным задачам и полностью обоснованы полученными экспериментальными данными.

В целом, работа, выполненная Алиной Асатовной, интересна и перспективна в свете дальнейшего изучения взаимного влияния GDNF и серотониновой системы мозга.

Таким образом, диссертация Алины Асатовны соответствует критериям, которым, согласно Положению о присуждении ученых степеней, должна соответствовать диссертация на соискание ученой степени кандидата наук. Таким образом, диссертационная работа Семёновой Алины Асатовны «Влияние глиального нейротрофического фактора (GDNF) на поведение и серотониновую систему мозга мышей с генетической предрасположенностью к

патологическому поведению» является законченной научно-квалификационной работой, выполненной под руководством доктора медицинских наук, профессора Н.К.Поповой, содержащей принципиально новое решение актуальной задачи – исследования физиологической роли глиального нейротрофического фактора, которая имеет существенное значение для физиологии, и Алина Асатовна Семенова заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.01 – физиология.

Официальный оппонент

с.н.с. лаборатории хронофизиологии НИИФФМ

к.б.н., Храпова М.В.

Адрес: 630117, г.Новосибирск, ул. Тимакова, 4

Телефон: +7(913)379-22-89

Электронная почта: khrapova@physiol.ru



Подпись *Храпова М.В.*
Заведующий
Начальник ОК *АХ*
07.04.2016г