



**ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО
НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ**

**Федеральное государственное
бюджетное учреждение науки
Институт теоретической и
экспериментальной биофизики
Российской академии наук
(ИТЭБ РАН)**

142290 Пушкино Московской области,
ул. Институтская, 3
Тел. (495) 632-78-69 Факс (4967) 33-05-53
E-mail: office@iteb.ru
ОКПО 00454592, ОГРН 1025007770920
ИНН/КПП 5039002070/503901001

Утверждаю

Директор ИТЭБ РАН

Д.б.н., профессор



И.П. Белецкий

2016

15.03.16 № *12308/21715-02*

На № _____ от _____

ОТЗЫВ

ведущей организации о научно-практической значимости диссертации **Семёновой Алины Асатовны** «Влияние глиального нейротрофического фактора (GDNF) на поведение и серотониновую систему мозга мышей с генетической предрасположенностью к нарушениям поведения», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.01 – «физиология».

Актуальность диссертационной работы

Нейротрофические факторы относятся к регуляторным белкам, которые во время эмбрионального развития способствуют пролиферации, дифференцировке и поддержанию жизнеспособности и функционирования периферических и центральных нейронов. В зрелом мозге нейротрофины способны влиять на синаптическую передачу, участвуя в обеспечении пластичности нервной системы, необходимой для ее нормального функционирования. Глиальный нейротрофический фактор (GDNF), фактор роста нервов (NGF), нейротрофический фактор мозга (BDNF) обеспечивают условия для выживания, обслуживания и регенерации нейрональных популяций. Их дефицит связывают с рядом

патологических состояний, и поэтому нейротрофические факторы рассматриваются как потенциальные терапевтические средства для нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера и Хантингтона. Один из этих факторов – GDNF, был выявлен из-за его способности поддерживать развитие эмбриональных нейронов, но впоследствии были охарактеризованы его функции и в зрелом мозге. Нейропротективные эффекты GDNF, выявленные, например, с применением экспериментальных моделей паркинсонизма на животных показали, что этот фактор может быть перспективным для клинического применения, особенно если преодолеть определенные сложности его целевой доставки к клеткам ЦНС. Необходимость понимания фундаментальных механизмов действия экзогенно вводимых нейротрофических факторов определяет актуальность предпринятого автором исследования.

Научная новизна исследования и значимость полученных результатов

Диссертация Семеновой А.А. содержит новые данные о функции GDNF в мозге мышей, генетически предрасположенных к каталепсии. В работе использовано две линии мышей – CBA и ASC. Селекция на высокую предрасположенность к каталепсии привела к формированию депрессивноподобных характеристик поведения и этой характеристикой животные линии ASC отличается от родительской линии мышей CBA. Впервые показано, что после введения GDNF в желудочки мозга достигается значительное снижение проявлений каталептического замирания у животных, при этом происходит улучшение показателей обучения в водном лабиринте Морриса у мышей линии ASC. Важные данные были получены при исследовании взаимовлияния GDNF и серотонинергической системы мозга: результаты показали, что однократное введение GDNF в мозг мышам линии ASC приводит к долговременным изменениям в экспрессии ключевых генов системы серотонина. Диссертант справедливо подчеркивает, что ослабление проявлений генетически детерминированной каталепсии после экзогенного введения GDNF, снижение уровня тревожности у животных, улучшение показателей обучения в водном тесте Морриса, а также сдвиги в уровне экспрессии генов серотонинергической системы указывают на нейропротекторный потенциал GDNF. Результаты, полученные при изучении взаимовлияния 5-HT и GDNF, вносят определенную ясность в механизмы патологических форм поведения, а также этиологию психических заболеваний, связанных с дисфункцией системы серотонина.

Основные научные результаты

В работе Семеновой А.А. получены результаты, существенно проясняющие роль GDNF в механизмах патологических процессов в мозге, а также терапевтический потенциал этого нейротрофического фактора. Показано, что у мышей линии CBA однократное внутрижелудочковое введение GDNF приводит к снижению среднего времени каталептического замирания. У этой линии мышей, тем не менее, антидепрессантного действия GDNF не оказал, а наоборот, увеличил время неподвижности в тесте «подвешивание за хвост». При обучении мышей линии CBA в водном лабиринте Морриса, как и при выполнении теста «закапывание шариков», автор не обнаружил влияния GDNF. Что касается влияния GDNF на мышей ASC, склонных к депрессивноподобному поведению, тесты показали, что на них нейротрофин оказывает антикаталептическое и анксиолитическое действие (по результатам теста приподнятого крестообразного лабиринта и «свет-темнота»). Кроме того, у мышей линии ASC введение GDNF привело к значительному улучшению обучению в лабиринте Морриса. Однако тест вынужденного плавания выявил увеличение времени неподвижности у животных, что рассматривается как усиление депрессивноподобного поведения. Кроме того, GDNF оказал значительное влияние на стереотипное поведение мышей линии ASC в тесте «закапывание шариков»,

Значительный интерес представляют результаты исследования влияния GDNF на серотонинергическую систему мозга. Исследования уровня экспрессии ключевых генов серотониновой системы выявили существенные различия ее активности в мозге животных разных линий в ответ на внутримозговое введение GDNF: значительные изменения были обнаружены у мышей линии ASC, но не CBA. Отметим, что изменения в экспрессии генов происходили через значительный промежуток времени после однократного введения GDNF – через 22-25 суток. Эксперименты показали повышенный уровень экспрессии 5-HT_{1A} рецепторов и ТПГ-2 в среднем мозге, повышение уровня экспрессии 5-HT_{2A} рецепторов во фронтальной коре, и снижение уровня экспрессии 5-HT_{1A} рецепторов в гиппокампе мышей линии ASC.

Таким образом, полученные в диссертации результаты показали, что эффекты экзогенно введенного GDNF зависят от генотипа животных, и в результате действия этого нейротрофического фактора могут произойти изменения в поведении, как позитивные (снижение выраженности каталепсии, снижения уровня тревожности и улучшение показателей обучения), так и негативные (увеличение выраженности депрессивноподобного и стереотипных форм поведения).

Структура диссертации

Работа А.А. Семеновой построена по традиционному плану. «Введение» содержит краткое обоснование актуальности, теоретической и научно-практической ценности работы; сформулированы цель и задачи исследования. Далее следует раздел «Глава 1. Обзор литературы. Глиальный нейротрофический фактор. Функции. Влияние на поведение. Взаимодействие с 5-НТ системой мозга», в котором изложены основные современные представления о функции GDNF, его влиянии на поведение, анализируются данные литературы о взаимодействии между GDNF и серотонинергической системой мозга. Диссертант, базируясь на результатах, описанных в литературе, делает вполне обоснованное заключение, что для понимания функциональной роли GDNF необходимы более детальные исследования с привлечением экспериментальных моделей патологических состояний у животных. Основное внимание автор предлагает сосредоточить на взаимовлиянии GDNF и серотонинергической системы мозга. Следует признать, что в этой области знания проведено недостаточно исследований для определения роли системы серотонина в эффектах GDNF. Оценивая этот раздел диссертации, отметим, что чрезмерная краткость изложения имеющихся в литературе результатов имеет положительные стороны – он посвящен тем конкретным вопросам, на которые нацелена работа. Тем не менее, учитывая огромный литературный материал, который касается, например, роли серотонинергической системы в механизмах функций мозга в условиях нормы и патологии, можно было бы ожидать более подробный анализ имеющихся данных. Кроме того, можно отметить скупой иллюстративный материал в «Обзоре литературы» – в нем всего один рисунок.

Глава 2 диссертации «Материалы и методы» написана исчерпывающе подробно, в ней дается описание поведенческих тестов, отдельных этапов определения экспрессии генов и методов обработки и анализа данных. Незначительные неточности и пропуски (так, в последней строчке Таблицы 1, где указаны праймеры генов, не указан ген) не снижают хорошего впечатления от этого раздела. Кроме того, желательно было бы показать на схеме, как разделялись структуры мозга животного при их выделении для анализа экспрессии генов.

В Главе 3 «Результаты» изложена основная информация, полученная автором при выполнении работы. Этот раздел содержит 15 рисунков и 8 таблиц, наглядно и детально показывающие полученные данные. На диаграммах и в таблицах указаны необходимые разбросы данных, параметры статистической обработки. Сначала описаны результаты

поведенческих тестов у мышей линии CBA, затем линии ASC, после чего проведено сравнительное описание эффектов GDNF между линиями животных. Такая последовательность изложения материала является логичной и удобной для восприятия читателя. В разделах 3.2 и 3.3 изложены данные по влиянию GDNF на экспрессию ключевых генов серотонинергической системы и функцию серотониновых рецепторов. Описание результатов оставляет хорошее впечатление и следует высоко оценить этот раздел диссертации.

Глава 4 «Обсуждение результатов» посвящена сопоставлению полученных данных с результатами работ других авторов. Основное внимание автор уделил влиянию GDNF на поведение двух линий мышей, склонных к каталепсии – CBA и ASC, а также роли серотонинергической системы мозга в эффектах GDNF. Достаточно подробно и интересно обсуждается роль пре- и постсинаптических рецепторов серотонина в механизмах депрессии, изменение их активности при действии GDNF на мозг. Этот раздел показывает, что автор понимает биологический и физиологический смысл полученных в диссертации новых фактов, направлений дальнейших исследований. Автор справедливо полагает, что для углубления знаний о фундаментальных механизмах действия GDNF на мозг необходимо исследовать молекулярные механизмы, с помощью которых осуществляется взаимовлияние GDNF и различных нейромедиаторов.

Выводы, которые А.А. Семенова делает на основании совокупности данных, представленных в работе, полностью обоснованы. Тем не менее, можно отметить, что в них, в основном, лишь перечисляется полученный экспериментальный материал, без желательного обобщения полученных результатов.

Список цитированной литературы составляет 216 источников. Автореферат соответствует содержанию диссертации.

Основная часть полученных результатов представлена в публикациях (3 статьи в журналах из списка ВАК РФ и международных периодических изданиях, тезисы выступлений на всероссийских и международных конференциях).

Общие замечания

При общей позитивной оценке диссертации отметим некоторые недочеты. В работе для выявления функциональной активности 5-HT_{1A} рецепторов определяли выраженность гипотермической реакции в ответ на введение 8-OH-DPAT (Overstreet et al., 1996). Несомненно, что такая реакция характеризует 5-HT_{1A} рецепторы, однако следовало бы указать на некоторые ограничения и относительность этой характеристики, так как

селективность действия 8-OH-DPAT на 5-HT_{1A}-рецепторы, как предполагалось первоначально, не подтвердилась и было обнаружено, что это вещество является, например, также агонистом 5-HT₇ рецепторов (Sprouse et al., *Neuropharmacology*, 2004, 46, Issue 1, 52–62).

Можно отметить также некоторое упрощенное представление диссертанта относительно причин, которые лежат в основе механизмов обучения и памяти. Автор выдвигает предположение: «Вероятно, однократное введение GDNF приводит к улучшению показателей пространственного обучения и памяти у животных за счет способности GDNF усиливать синтез нейротрансмиттеров, таких как серотонин и дофамин. С. 64». Отсюда можно понять, что увеличение синтеза этих нейротрансмиттеров обеспечивает улучшение выработки гиппокамп-зависимого навыка.

К общим замечаниям можно отнести также вопросы, касающиеся моделирования на животных нейрологических заболеваний человека. В работе А.А. Семеновой применялись разнообразные поведенческие методы, с достаточной полнотой характеризующие особенности некоторых патологий. Очевидные ограничения, возникающие при переносе на человека результатов и выводов, полученных в экспериментах на животных, не позволяют отождествлять патологические состояния. Это и проявляется в работе, когда рассматривается депрессивноподобное состояние. Однако обсессивно-компульсивное поведение человека терминологически прямо соотносится со стереотипиями у мышей при проведении теста «закапывание шариков».

Указанные недостатки не снижают ценности проведенного исследования, а скорее являются пожеланиями для будущей работы в этом направлении.

Заключение

В целом, можно заключить, что диссертация А.А. Семеновой «Влияние глиального нейротрофического фактора (GDNF) на поведение и серотониновую систему мозга мышей с генетической предрасположенностью к нарушениям поведения», выполненная в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, является законченной научно-квалификационной работой, которая имеет важное практическое и теоретическое значение для понимания функциональной роли GDNF в условиях нормы и патологии и соответствует требованиям постановления Правительства РФ от 30 января 2002 г. №74 – Положения о порядке присуждения ученых степеней (в ред. Постановлений Правительства РФ от 12.08.2003 №490, от 20.04.2006 №227, от 04.05.2008 №330, от

02.06.2008 №424, от 31.03.2009 №279, от 20.06.2011 №475). Таким образом, работа Семеновой А.А. полностью отвечает требованиям ВАК РФ, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.01 – физиология.

Диссертация и отзыв обсуждены и одобрены на совместном семинаре Лаборатории экспериментальной нейробиологии ИТЭБ РАН (Зав. Лаб. профессор О.В. Годухин) и Лаборатории системной организации нейронов ИТЭБ РАН (Зав. Лаб. д.б.н. В.Ф. Кичигина). 10 марта 2016 г. (протокол № 2).

В.н.с. Лаборатории экспериментальной нейробиологии ИТЭБ РАН, д.б.н.,

14 марта 2016 г.

В.И. Архипов

Данные об авторе отзыва: Архипов Владимир Иванович, доктор биологических наук, ведущий сотрудник Лаборатории экспериментальной нейробиологии ИТЭБ РАН.

Московская обл., г. Пущино, Институтская, 3.

Тел. (4967)739395

e-mail: viarkhipov@rambler.ru

