

УТВЕРЖДАЮ

Проректор –

начальник Управления научной политики
и организации научных исследований

МГУ имени М.В.Ломоносова

А.А.Федянин



«_» февраля 2015 г.

ОТЗЫВ

Федерального государственного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова» о научно-практической ценности диссертационной работы **ИВАНОВА Андрея Дмитриевича** «Исследование протекторных свойств нейротрофинов при угнетении синаптической пластичности в гиппокампе бета-амилоидным пептидом», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям «физиология» (03.03.01) и «молекулярная биология» (03.01.03).

Актуальность работы.

Диссертационная работа А.Д.Иванова посвящена актуальной проблеме современной нейробиологии - изучению роли нейрональных трофических факторов (нейротрофинов) в синаптической пластичности. В работе поставлены 2 четко сформулированные задачи. 1) Изучить роль фактора роста нервов (NGF) и нейротрофического фактора мозга (BDNF) как возможных эндогенных регуляторов длительной потенциации (ДП) суммарного ВПСП в гиппокампе. 2) Показать возможную протекторную способность NGF и BDNF восстанавливать ДП в гиппокампе, которая подавлена β -амилоидным пептидом (экспериментальная модель болезни Альцгеймера). Обе задачи оригинальные. Они имеют фундаментальный и прикладной аспекты, что является несомненным достоинством исследования.

Структура и объем диссертации.

Диссертация состоит из введения, обзора литературы (глава 1), описания методов исследования (глава 2) и четырех экспериментальных глав, каждая

из которых включает описание результатов и их обсуждение (главы 3,4,5,6), заключения, выводов и списка литературы (142 источника). Работа содержит 11 рисунков. Объем рукописи – 82 стр; а без списка литературы – 66 стр.

Обзор литературы (Глава 1).

Обзор занимает 12 стр. (18% от текста без списка литературы). Такой нетипично малый объем раздела поначалу смущает. Однако, по мере прочтения приходишь к заключению, что для лаконичного и четкого стиля написания текста А.Д.Ивановым этот объем, вероятно, достаточен. Хотя автор мог бы уделить большее внимание в этом разделе описанию механизмов ДП в гиппокампе и проанализировать, какое место в этих механизмах занимают нейротрофины. В обзоре содержатся сведения об используемых в диссертации нейротрофинах – NGF и BDNF. Автор описывает синтез, процессинг, транспорт, их нейрональные рецепторы, локализацию в мозге и функции этих сигнальных молекул. Следует отметить, что данный раздел уже опубликован А.Д.Ивановым в виде обзорной статьи (*Иванов А.Д. Роль NGF и BDNF в регуляции деятельности зрелого мозга. Журн. высш. нерв. деят. 2014. 64(2): 137-146*).

Методы исследования (Глава 2).

Изложен раздел исключительно детально. Он занимает 14 стр (больше Обзора литературы) и тщательно структурирован – содержит 22! подраздела. Такая детализация оправдана, поскольку применение наравне с традиционным электрофизиологическим методом регистрации фокальных вызванных потенциалов современного и многоэтапного молекулярно-биологического метода по созданию генно-инженерных конструкций для обеспечения оверэкспрессии NGF и BDNF в гиппокампе – одно из основных достоинств и преимуществ диссертации А.Д.Иванова.

Для обеспечения долговременного устойчивого локального увеличения концентраций NGF и BDNF в гиппокампе экспериментальных животных были созданы генно-инженерные конструкции на базе лентивирусных векторов. Данная биоинженерная методика, использованная для обеспечения

продолженного действия биологически активных соединений обладает рядом преимуществ по сравнению с методами традиционной нейрофармакологии.

Первая экспериментальная глава (Глава 3), фактически, является продолжением методического раздела работы, поскольку в ней проведена оценки эффективности локальной лентивирусной трансдукции клеток зубчатой фасции генами NGF и BDNF.

Вторая экспериментальная глава (Глава 4). В ней показано, что в нормальных условиях избыток нейротрофинов NGF и BDNF не влияет на динамику ДП в зубчатой фасции *in vitro*.

Третья экспериментальная глава (Глава 5) содержит результаты, демонстрирующие 1) Часовая инкубация срезов мозга в 50 нМ растворе бета-амилоидного пептида (A β) препятствует индукции ДП. 2) Протекторные способности NGF и BDNF различались. Фактор роста нервов оказывал нейропротекторное действие, а нейротрофический фактор мозга – нет.

Четвертая экспериментальная глава (Глава 6). В ней показано, что реализация нейропротекторного эффекта фактора роста нервов зависит от активности каскада фосфатидилинозитол-3-киназы.

Новизна полученных результатов. А.Д. Иванов впервые показал, что из двух родственных нейротрофинов (NGF и BDNF) только один (фактор роста нервов) обладает защитным действием на нейроны зубчатой фасции гиппокампа в патологических условиях. Впервые исследована роль киназных каскадов рецептора TrkA в реализации протекторного эффекта увеличения уровня NGF вследствие его оверэкспрессии.

Положения выносимые на защиту. Их 2:

1. Двукратный избыток фактора роста нервов защищает нейроны зубчатой фасции крыс Вистар P20-P25 от патогенного действия β -амилоидного пептида (25-35). Обнаруженный нейропротекторный эффект реализуется через активацию киназного каскада фосфатидилинозитол-3-киназы.

2. Увеличение концентрации нейротрофического фактора мозга в зубчатой фасции гиппокампа не изменяет нормальную динамику ДП *in vitro* и не оказывает заметного нейропротекторного эффекта.

Диссертация хорошо оформлена. Текст диссертации лаконичный, логично структурирован и изложен понятным, грамотным языком. Иллюстрации информативные, высокого качества. Автореферат отражает содержание диссертации.

Публикации по теме диссертации.

Опубликовано 3 статьи в центральных рецензируемых журналах. Из них 2 статьи - в российских журналах: Журнале высшей нервной деятельности им. И.П.Павлова (IF=0.213) и Нейрохимия (IF=0.193). Важно отметить, что 1 статья опубликована в высокорейтинговом международном журнале *Neuroscience* с высоким импакт-фактором (IF=3.327).

Научно-практическая значимость работы.

В теоретическом плане полученные в диссертации результаты дополняют современные представления о клеточных механизмах пластичности нервной системы, лежащих в основе обучения. В практическом плане методические приемы, приводящие к локальному хроническому увеличению концентрации нейротрофинов в ЦНС, представляют практический интерес, так как могут в будущем быть применены в клинике.

Замечания.

- (Стр.35, раздел 2.2.11, Обработка результатов). В этом методическом разделе не указано: 1) За какой временной интервал считали среднюю амплитуду фокального ответа до тетанизации? 2) За какой временной период вычисляли среднюю амплитуду суммарного ВПСП после тетанизации? 3) В каких случаях при статистической обработке использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA), а в каких - t-тест Стьюдента.

- Почему в главах 3,4 и 6 для оценки различий между группами применяли однофакторный дисперсионный анализ, а в главе 5 – критерий Стьюдента?
- Следовало обсудить, почему бета-амилоидный пептид в концентрации 100 нМ не только подавлял индукцию ДП, но также приводил к депрессии фокального ВПСП.
- В диссертации установлено, что β -амилоидный пептид не изменял ДП в концентрации 20 нМ и полностью блокировал ее в концентрации 50 нМ. «Для дальнейших экспериментов была выбрана концентрация раствора А β 50 нМ – минимальная достаточная для предотвращения индукции LTP (стр. 53)». Это утверждение неточно, 50 нМ – концентрация минимальная из испытанных в работе для предотвращения индукции ДП. Можно было применить другую стратегию. Исследовать эффекты β -амилоидного пептида на ДП в концентрациях более 20 нМ – менее 50 нМ, чтобы выявить эффект частичного подавления ДП. Эффект угнетения β -амилоидным пептидом синаптической пластичности более чувствительный для исследования протекторной способности нейротрофинов нежели полное подавление пластичности. Кроме того такая стратегия в большей степени соответствовала бы названию диссертации «Исследование протекторных свойств нейротрофинов при **угнетении синаптической пластичности** в гиппокампе β -амилоидным пептидом».
- (Стр. 41). «Средняя концентрация NGF после лентивирусной трансдукции составила 1830 ± 48 пг/мл (n=6) в ипсилатеральных гиппокампах, тогда как в контралатеральных гиппокампах тех же животных она равнялась 833 ± 88 пг/мл (n=6)». Эти результаты свидетельствуют о наличии в гиппокампе интактной (без лентивирусной трансдукции) крысы базального уровня эндогенного NGF, который должен препятствовать повреждающему действию β -

амилоидного пептида на ДП. В таком случае на фоне блокатора *LY294002*, предотвращавшего протекторную способность фактора роста нервов, пороговая концентрация повреждающего действия β -амилоидного пептида на ДП должна снизиться, а степень эффекта - возрасти. Вы проверяли такую возможность? И, если нет, то почему?

- Положение № 2 (в части отсутствия протекторного эффекта BDNF) дискуссионно. Нельзя исключить, что BDNF как и NGF обладает способностью ослаблять повреждающее действие бета-амилоидного пептида на ДП, но в меньшей степени. Такое протекторное действие BDNF могла бы выявить серия с β -амилоидным пептидом в концентрации менее 50 нМ, вызывающей частичное уменьшение ДП, а не полное ее подавление.
- В выводе 4 корректнее было вместо «нарушения пластичности» употребить более точное словосочетание «нарушение длительной потенциации».

Приведенные выше замечания являются дискуссионными и не снижают высокую оценку работы.

Конкретные рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы.

Результаты и выводы диссертации А.Д.Иванова могут быть использованы в научно-исследовательской работе Института физиологии им. И.П.Павлова РАН, Института эволюционной физиологии и биохимии РАН, Института нормальной физиологии им. П.К.Анохина, Научного Центра неврологии, на биологическом и психологическом факультетах Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова, биологических факультетах Санкт-Петербургского и Приволжского государственных университетов.

Заключение.

Диссертация А.Д.Иванова выполнена на высоком научном уровне с применением комплекса современных электрофизиологических и молекулярно-биологического методик. Это научная квалификационная работа, в которой получены новые важные результаты о протекторном действии нейротрофина, фактора роста нервов, на длительную потенциацию ослабленную бета-амилоидным пептидом в гиппокампе крысы.

Работа соответствует критериям ВАКа для кандидатских диссертаций (Положение об ученых степенях 2013 года, пункт II.9), а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям «физиология» (03.03.01) и «молекулярная биология» (03.01.03).

Отзыв на диссертационную работу А.Д. Иванова обсужден и утвержден на заседании кафедры высшей нервной деятельности биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова 19 февраля 2015 года (протокол № 3).

Главный научный сотрудник
кафедры высшей нервной деятельности,
Биологического факультета МГУ,
доктор биологических наук, профессор
_____ А.С. Пивоваров

Ученый секретарь кафедры высшей нервной деятельности
Биологического факультета МГУ
доктор биологических наук, профессор
_____ Р.А. Данилова

Заведующий кафедрой высшей нервной деятельности
Биологического факультета МГУ
доктор биологических наук, профессор

А.В. Латынов

