

ОТЗЫВ ОППОНЕНТА

**на диссертационную работу Третьяковой Лии Викторовны
«ИССЛЕДОВАНИЕ ДИСТАНТНОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ ГИППОКАМПА ПРИ
ФОКАЛЬНОМ ПОВРЕЖДЕНИИ МОЗГА: КОРТИКОСТЕРОИДНАЯ СИСТЕМА И
НЕЙРОВОСПАЛЕНИЕ»,
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по
специальности 1.5.5. – физиология человека и животных**

Актуальность темы исследования

Черепно-мозговые травмы являются важной проблемой современной медицины из-за их распространенности и гетерогенности случаев. Известно, что черепно-мозговые травмы приводят к гибели пораженных частей мозга, развитию воспаления в очаге повреждения и нарушению функций, связанных с поврежденной частью мозга. Однако, согласно современным клиническим данным, у большинства пациентов черепно-мозговая травма вызывает отсроченные последствия в виде коморбидных когнитивных и эмоциональных расстройств, вплоть до деменции и депрессии. Такие нарушения характерны для дисфункции гиппокампа, который в момент травмы в большинстве случаев напрямую не затрагивается. Таким образом, наблюдаемое отсроченное повреждение гиппокампа является дистантным относительно первичной области повреждения. Механизм дистантного повреждения гиппокампа, индуцированного черепно-мозговой травмой, а также гетерогенность ответа вдоль дорсовентральной оси гиппокампа и между полушариями остаются не исследованными. Представленная к защите работа расширяет представления о процессах, протекающих в различных частях гиппокампа при черепно-мозговой травме, а также о роли глюкокортикоидов и нейровоспаления в повреждении гиппокампа при данной патологии.

Структура и содержание диссертации

Структура и содержание диссертации Третьяковой Л.В. соответствует требованиям ВАК. Диссертация построена по традиционному плану и содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение полученных результатов, заключение и выводы. Диссертация содержит 49 рисунков, изложена грамотным академическим языком на 114 страницах машинописного текста. Библиографический указатель содержит 6 отечественных и 189 зарубежных источников.

Во «Введении» автором обосновывается актуальность проблемы исследования, его новизна и значимость, формулируются основные направления исследования, цели, задачи и положения, выносимые на защиту.

«Обзор литературы» включает как зарубежные, так и отечественные источники, рассмотрены ключевые работы в данной области. Изложены сведения о роли стресс-реализующих систем и системы нейровоспаления, охарактеризованы гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая система, глюкокортикоидные и минералокортикоидные рецепторы, про- и противовоспалительные цитокины (IL-1 β , IL-6, TNF α , CCL2, TGF β), проведен анализ про- и противовоспалительного действия глюкокортикоидов, их роли в развитии острого и хронического нейровоспаления. Подробно охарактеризованы преимущества и недостатки применяемых экспериментальных моделей черепно-мозговой травмы и обоснован выбор модели гидродинамического удара для выполненного исследования. Структура и содержание этого раздела диссертации свидетельствует о компетентности автора в области исследуемой проблематики.

В разделе «Материалы и методы» диссертантом подробно изложены методики каждой из трех частей диссертационной работ. Использованные графические схемы наглядно представляют методологию трех направлений исследования: моделирование черепно-мозговой травмы, моделирование острого нейровоспаления в гиппокампе в условиях воздействия агониста глюкокортикоидных рецепторов – дексаметазона и моделирование острого нейровоспаления в гиппокампе в условиях воздействия ингибиторов глюкокортикоидных и минералокортикоидных рецепторов – мифепристона и спиронолактона, соответственно. Описаны способ нанесения черепно-мозговой травмы (модель латерального гидродинамического удара), внутригиппокампальная инъекция экспериментальных веществ, тест предпочтения сахарозы для оценки возможного развития депрессивно-подобного состояния, методики забора биоматериала, пробоподготовки, молекулярно-генетического, биохимического и морфологического анализов образцов гиппокампа животных (количественная ПЦР в «реальном времени», ИФА, окрашивание срезов по Нисслю, иммуногистохимическое окрашивание). Охарактеризованы методы статистической обработки. Используемая методическая база исследования свидетельствует о высоком профессиональном уровне соискателя.

Полученные данные изложены в разделе «Результаты», который состоит из трех больших подразделов. Первая часть посвящена исследованию временной динамики последствий фокального повреждения мозга на модели латерального гидродинамического удара – в ней изложены результаты анализа изменений морфологии, концентрации кортикостерона и основных провоспалительных цитокинов, а также экспрессии генов,

ассоциированных с реакцией на стресс и нейровоспалением, и генов микроглиальных маркеров. Вторая часть посвящена исследованию влияния агониста глюкокортикоидных рецепторов дексаметазона на экспрессию генов, связанных с нейровоспалением, и на морфологию микроглии в условиях острого нейровоспаления в гиппокампе. Третья часть посвящена исследованию влияния антагонистов глюкокортикоидного и минералокортикоидного рецепторов мифепристона и спиронолактона, соответственно, на экспрессию генов, связанных с нейровоспалением, и на морфологию микроглии в условиях острого нейровоспаления в гиппокампе.

В первом фрагменте исследования было показано, что на 3-и сутки после черепно-мозговой травмы вблизи места повреждения – дорсальном ипсилатеральном гиппокампе начинается гибель нейронов, к 7-м суткам распространяющаяся в дорсальный контралатеральный гиппокамп. Гибель нейронов на всей протяженности дорсовентральной оси гиппокампа сопровождается нарастанием микроглии. Параллельно, вплоть до 7-х суток, как в прилежащих к зоне нанесения травмы, так и в отдаленных структурах гиппокампа наблюдалось возрастание уровня экспрессии генов основных провоспалительных цитокинов (*Il1b*, *Il6* и *Tnf*). Воспалительный ответ не носил генерализованного характера, поскольку в крови изменений концентраций цитокинов $IL-1\beta$, $IL-6$ и $TNF\alpha$ не было обнаружено. Стрессовый ответ на 3-и сутки после черепно-мозговой травмы сопровождался подъемом концентрации кортикостерона как в гиппокампе, так и в крови. Значимых изменений уровня экспрессии генов, ассоциированных с системой реакции на стресс (*Crh*, *Crhr1*, *Crhr2*, *Nr3c1*, *Nr3c2*), не было выявлено.

Во втором фрагменте исследования было показано, что в условиях острого локального нейровоспаления, вызванного липополисахаридом, введение дексаметазона – агониста глюкокортикоидных рецепторов вызывает достоверное снижение уровня экспрессии связанных с нейровоспалением генов *Il6*, *Ccl2*, а также тенденцию к снижению экспрессии *Cx3cl1*, что в данной ситуации характеризует дексаметазон как противовоспалительный агент. При этом введение дексаметазона не предотвращало изменений морфологии микроглии, возникающих в результате ЛПС-индуцированного нейровоспаления в дорсальном гиппокампе. В поведенческом тесте достоверное снижение предпочтения сахарозы было показано для группы животных после комбинированной инъекции Декс и ЛПС на 1-е и 2-е сутки после операции при сравнении с этими же животными до операции, что указывает на развитие стресс-реакции.

В третьем фрагменте исследования было показано, что в условиях острого локального нейровоспаления, вызванного липополисахаридом, блокада

глюкокортикоидных или минералокортикоидных рецепторов специфическими антагонистами мифепристоном и спиронолактоном, соответственно, не оказывает значимого влияния на экспрессию генов основных провоспалительных цитокинов. Ингибирование обоих типов рецепторов в процессе развития ЛПС-индуцированного воспаления не влияло на морфологию микроглии, оставляя клетки в активированном состоянии. Достоверных изменений потребления сахарозы в поведенческом тесте не было отмечено.

В целом, полученные результаты изложены объективно, с достаточной полнотой, хорошим языком, поддержаны качественной графической информацией – микрофотографиями гистологических препаратов и многочисленными диаграммами.

В разделе «Обсуждение полученных результатов» соискателем на основании анализа собственных данных и литературных источники сформулированы новые представления о посттравматической динамике развития структурных изменений и временной динамике цитокинового ответа в разноудаленных по отношению к месту кортикального удара отделах гиппокампа, против- и провоспалительной роли кортикостерона на разных этапах развития нейровоспаления, о роли глюкокортикоидных и минералокортикоидных рецепторов в развитии нейровоспалительного ответа в гиппокампе. На этой основе диссертантом сформулированы новые аспекты, важные для установления специфики развития посттравматических когнитивных и эмоциональных расстройств.

В **«Заключении»** автор подводит основные итоги проведенного экспериментального исследования. Сформулированные выводы обоснованы полученными первичными данными, полностью соответствуют поставленным задачам, их достоверность не вызывает сомнений.

Новизна исследования, полученных результатов и выводов, сформулированных в диссертации

В диссертационной работе Третьяковой Л.В. получены новые данные о временной динамике структурных изменений и течения нейровоспалительного и стрессового ответов в ранний период после черепно-мозговой травмы в гиппокампе в зависимости от близости к месту травмы (ипсилатеральное или контралатеральное полушарие) и расположения вдоль септотемпоральной оси (дорсальный или вентральный гиппокамп). В данной работе впервые показано, что после черепно-мозговой травмы в дорсальном ипсилатеральном гиппокампе возникает гибель нейронов и микроглиоз, которые со временем распространяются вдоль его септотемпоральной оси и между полушариями. Третьяковой

Л.В. впервые показано влияние внутригиппокампальной модуляции активности глюкокортикоидного и минералокортикоидного рецепторов на компоненту нейровоспаления, связанную с экспрессией генов цитокинов, а также на состояние микроглии.

Выводы, сформулированные в диссертации Третьяковой Л.В., являются новыми и расширяют область знания о возможных механизмах, лежащих в основе дистантного повреждения гиппокампа при фокальных повреждениях мозга.

Значимость полученных автором результатов для науки и практики.

Значимость представленной работы определяется тем, что диссертантом в комплексном исследовании охарактеризована временная динамика дистантной гибели нейронов и сопровождающего ее микроглиоза в ипсилатеральном и контралатеральном гиппокампах, концентраций основных провоспалительных цитокинов и кортикостерона, экспрессии мРНК генов, ассоциированных с нейровоспалением и реакцией на стресс. Полученные данные расширяют современные представления о процессах, протекающих в различных частях гиппокампа после черепно-мозговой травмы, а также о влиянии локального применения глюкокортикоидов на нейровоспаление в гиппокампе. Результаты представленного к защите исследования могут быть использованы при разработке методик профилактики и лечения расстройств когнитивного и эмоционального спектров, в патогенезе которых присутствуют нейровоспаление, микроглиоз и гибель нейронов в гиппокампе.

Степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов, сформулированных в диссертации

Обоснованность и достоверность полученных научных положений и выводов обеспечивается продуманными схемами экспериментов, достаточным размером выборок, грамотным статистическим анализом.

Соответствие содержания автореферата содержанию диссертации

Содержание автореферата полностью соответствует содержанию диссертации.

Сведения о полноте опубликованных научных результатов

По теме диссертации опубликовано 3 печатные работы, все в рецензируемых журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве

образования и науки Российской Федерации и международных журналах, индексируемых в базе Web of Science/Scopus.

Замечания по работе

1. В обзоре литературы был бы уместен заключительный раздел, фокусирующий внимание на «горячих точках» проблемы повреждения гиппокампа при черепно-мозговой травме, обосновывающий выбор направления исследований в планируемой работе.
 2. В работе не описано обоснование выбора морфологических зон для анализа микроглиоза после внутригиппокампальных инъекций экспериментальных веществ.
 3. В разделе «Материалы и Методы» отсутствует Таблица 1, представляющая нуклеотидные последовательности праймеров, использованных для синтеза транскриптов целевых генов (стр.40).
 4. При выбранном формате представления данных на рисунках 35 и 47 не визуализируется ряд диаграмм (рис.35 – б, в, д, е; рис.47 – б, г, д). К сожалению, в описании соответствующих рисунков (стр.75 и стр.83, соответственно) численные значения не приведены, что мешает читателю оценивать эффекты развития микроглиоза.
 5. По-видимому, из-за большого разброса измеренных значений (как это видно из представленных диаграмм) анализ поведенческих эффектов в тесте предпочтения сахарозы, проводившийся в условиях ЛПС-индуцированного воспаления во втором и третьем фрагментах исследования, носит ограниченный характер и не исчерпывает полученных результатов.
 6. Текст переполнен аббревиатурами, что затрудняет восприятие представленного материала.
- Данные замечания не снижают ценности диссертации, не несут принципиального характера и являются уточняющими.

Конкретные рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

Полученные в работе данные по временной динамике структурных изменений и течения нейровоспалительного и стрессового ответов в ранний период после черепно-мозговой травмы в гиппокампе, а также по участию глюкокортикоидов в течении локального нейровоспаления могут быть использованы научно-исследовательскими институтами для планирования экспериментальных и клинических исследований в этой области.

Заключение о соответствии диссертации критериям, установленным Положением о порядке присуждения ученых степеней

По актуальности, новизне, теоретической и практической значимости, достоверности полученных результатов диссертационная работа Третьяковой Л.В. является самостоятельным законченным исследованием, полностью соответствует требованиям п. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. №842 (в ред. Постановления Правительства РФ от 21.04.2016 г. №335), предъявляемым к диссертационным работам на соискание ученой степени кандидата биологических наук, Считаю, что соискатель Третьякова Лия Викторовна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.5 – физиология человека и животных.

Официальный оппонент:

д.б.н. по специальности 03.01.04 «Биохимия» (03-00-04), 03.00.16 «Экология»,
ведущий научный сотрудник лаборатории экспериментальной и трансляционной
нейрохимии отдела молекулярных и клеточных механизмов нейропластичности
Института мозга Федерального государственного бюджетного научного учреждения
«Научный центр неврологии»

28.11.2022

Стволинский Сергей Лейбович

Адрес места работы:

125367, г. Москва, Волоколамское шоссе, д.80, ФГБНУ НЦН

Тел.: 8(495)490-2408 (служ.), +7(916)516-5004

e-mail: stvolinsky@neurology.ru

Подпись вед.н.сотр. Стволинского С.Л. удостоверяю

Ученый секретарь ФГБНУ «Научный центр неврологии»

К.М.Н.



Сергеев Дмитрий Владимирович