

## ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук, профессора СЕЛЯТИЦКОЙ Вера Георгиевны на диссертационную работу ЛАНШАКОВА Дмитрия Александровича «Эффекты гипоксии и глюкокортикоидов на программируемую гибель клеток неонатального мозга», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.01 – физиология

**Актуальность избранной темы.** Исследования механизмов действия глюкокортикоидных гормонов проводятся уже несколько десятилетий, и это обусловлено их определяющей ролью в гомеостатических и адаптивных реакциях организма. Основные вопросы, на которые ищут ответы исследователи, это определение тканей-мишеней для глюкокортикоидных гормонов, выяснение внутриклеточных механизмов их действия, исследование структуры рецепторов и их связывания с глюкокортикоид респонсивными элементами в геноме, изменение экспрессии генов и последующие изменения синтеза ферментов и других белков. Ответы на эти вопросы крайне важны, но получить полную расшифровку механизмов действия глюкокортикоидных гормонов пока еще не представляется возможным. Актуальность исследований в этой области усиливается еще и потому, что экзогенные глюкокортикоидные гормоны широко применяются в медицинской практике.

Следует отметить, что постоянно развиваются новые и совершенствуются имеющиеся исследовательские технологии, направленные на расшифровку механизмов действия гормонов. Диссертационная работа Ланшакова Д.А., направленная на изучение действия глюкокортикоидных гормонов на процессы программируемой клеточной гибели в неонатальном мозге, а также исследование взаимоотношений глюкокортикоидных гормонов и гипоксии в регуляции активности ферментов апоптоза в неонатальном кортексе, как раз и является типичным примером применения новых методик для изучения механизмов действия глюкокортикоидных гормонов на этапах онтогенеза. Тема диссертационной работы, безусловно, актуальна, современна и полностью отвечает требованиям к квалификационным диссертационным исследованиям. Особый интерес тема

диссертационной работы Ланшакова Д.А. представляет еще и в связи с необходимостью изучения процессов нейрогенеза в перинатальный период, когда в раннем онтогенезе на длительное время программируются особенности поведения и когнитивного развития.

**Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и рекомендаций.** Достоверность, обоснованность научных положений и выводов, сформулированных в диссертации, подтверждены ее высоким научно-методическим уровнем. В работе приведен большой фактический материал, полученный непосредственно автором в ходе выполнения экспериментальных исследований на достаточном для решения поставленных задач количестве животных.

В работе автором применены современные экспериментальные методы моделирования – введение препаратов крысятам первых дней после рождения, транскардиальная перфузия, гипоксия. После декапитации из мозга крысят извлекали гиппокамп и фронтальную кору для последующего выделения тотальной РНК, используя ее в качестве матрицы для синтеза кДНК, количество мРНК определяли методом ПЦР в реальном времени. Проводили иммуногистохимическое исследование структур мозга, выявление фрагментированной ДНК, гистологические препараты исследовали методом световой микроскопии, для колокализационных экспериментов препараты исследовали на конфокальном микроскопе. Сравнительную оценку результатов автор проводил с использованием адекватных методов статистического анализа.

Все изложенное выше позволяет считать, что представленные автором результаты достоверны, а научные положения и выводы, в основу которых были положены полученные с использованием вышеуказанных методов результаты, полностью обоснованы.

**Научная новизна исследования.** Проведенный в работе анализ показал, что глюкокортикоидные рецепторы экспрессируются во многих структурах конечного мозга, что согласуется со сведениями из научной литературы. Определение типов клеток, экспрессирующих глюкокортикоидный рецептор в коре мозга крысят, впервые выявило, что глюкокортикоидный рецептор в энторинальной коре и CA1 поле гиппокампа



на третий день постнатального развития наиболее часто колокализован с маркером кальретениновых интернейронов и в меньшей степени - с маркером астроцитов.

Анализ острого действия глюкокортикоидных гормонов на апоптоз клеток дорзального субикулума показал, что уже через 6 часов после введения дексаметазона повышалось число апоптозных клеток, иммунопозитивных по активной каспазе-3, клеток с фрагментированной ДНК и с фрагментированными ядрами, что указывало на усиление программируемой клеточной гибели в этой структуре. Была выявлена роль ранней активации нейронов гиппокампа под влиянием дексаметазона в процессе программируемой клеточной гибели. Так, было показано, что дексаметазон активирует клетки CA1 гиппокампа, на что указывало повышение уровня мРНК и белка гена раннего ответа c-fos в первые 1-2 часа после введения гормона. Установлено участие механизма эксайтотоксичности в процессе гибели клеток субикулума при введении глюкокортикоида, поскольку предварительное введение антагониста NMDA глутаматных рецепторов мемантина снижало гибель клеток субикулума, индуцированную дексаметазоном.

Анализ отдаленных эффектов глюкокортикоидных гормонов и гипоксии (120 часов после воздействий) на процессы программируемой клеточной гибели показал, что повышение уровня активной каспазы-3 во фронтальной коре было выражено в большей степени в ответ на гипоксию, чем на введение дексаметазона. При этом впервые было выявлено, что предварительное введение гормона снижало выраженность ответа на гипоксию со стороны активной каспазы-3. Таким образом, полученные результаты развивают представления о модуляции процесса программируемой клеточной гибели в неонатальном мозге не только глюкокортикоидными гормонами, но и действием комплексного фактора - гормона и гипоксии.

**Общая характеристика работы.** Диссертационная работа Д.А. Ланшакова имеет традиционную композицию, оформлена в соответствии с требованиями ВАК и состоит из введения, обзора литературы; главы, посвященной описанию материала и методов исследования; главы, в которой

излагаются результаты собственных исследований; общего обсуждения, выводов и библиографии. Список цитированной литературы включает 281 источник, из них только один отечественный – это ссылка на монографию. Работа изложена на 129 страницах печатного текста, иллюстрирована 4 таблицами и 38 рисунками.

Во введении имеются все необходимые подразделы, представлена актуальность исследования, сформулированы цель и задачи, показана научная новизна исследования, его теоретическая значимость, сформулированы положения, выносимые на защиту, приводятся сведения об апробации диссертационной работы.

Обзор литературы написан весьма подробно и свидетельствует о том, что автор свободно ориентируется в современной научной литературе по изучаемой теме.

В главе 2 "Материалы и методы" детально описаны процедуры получения крысят, введения им препаратов и воздействия гипоксией. Все использованные при выполнении диссертационного исследования методики описаны подробно и с хорошим знанием используемых в работе исследовательских технологий.

В главе 3 приведены результаты диссертационного исследования по разделам. В разделе 3.1. представлены результаты определения экспрессии глюкокортикоидных рецепторов в мозге неонатальных крысят; в разделе 3.2. – влияния дексаметазона и гипоксии на морфологию головного мозга, а в разделе 3.3. – их влияние на апоптоз клеток головного мозга; в разделе 3.4. описано острое действие гормонов на активность клеток гиппокампа и апоптоз клеток дорзального субикулума; в разделе 3.5. – влияние блокады рецепторов глутамата на индуцируемую дексаметазоном гибель клеток субикулума. Главы хорошо иллюстрированы рисунками и микрофотографиями, убедительно показывают наличие большого фактического материала, который был получен и проанализирован автором, обосновывают научные положения и выводы, сформулированные в работе, их достоверность и новизну.



В обсуждении достаточно полно проведен анализ полученных результатов и их сравнение с литературными данными, сделаны необходимые обобщения.

Работа завершается выводами, которые носят конкретный характер, опираются на анализ полученных данных и соответствуют полученным результатам.

В целом диссертационную работу Ланшакова Дмитрия Александровича можно квалифицировать как законченное научное исследование, содержащее новые важные для биологической науки результаты.

Замечаний по научному содержанию работы нет. Однако соотношение объемов глав диссертационной работы вызывает недоумение. Так, величина литературного обзора – 44 страницы текста, а результатов – всего 34 страницы, включая рисунки, таблицы, микрофотографии, а также довольно большие вставки обсуждения результатов с цитированием литературы. Общее обсуждение при этом занимает всего 11 страниц. Из анализа текста видно, что автор плохо дружит с запятыми, которые расставлены по какой-то неизвестной оппоненту логике. В этой связи на будущее следует пожелать автору учиться более грамотно и развернуто писать основанные на своих результатах научные тексты.

Автореферат написан по требуемой форме, содержит всю необходимую информацию и соответствует содержанию диссертации.

Результаты, представленные в диссертации Д.А. Ланшакова, обсуждены на научных форумах, автором опубликовано 17 работ, среди которых две статьи в научных журналах из перечня ВАК, одна – в зарубежном журнале.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Диссертационная работа Д.А. Ланшакова «Эффекты гипоксии и глюкокортикоидов на программируемую гибель клеток неонатального мозга», выполненная под научным руководством доктора биологических наук, член-корр. РАН Н.Н. Дыгало и представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.01 –

физиология, является законченным научно-квалификационным исследованием, в котором содержится решение задачи, имеющей важное значение для физиологии - получены новые фундаментальные знания о роли глюкокортикоидных гормонов и их взаимоотношениях с гипоксией в механизмах регуляции процессов программируемой клеточной гибели в неонатальном мозге.

По актуальности, научной новизне, достоверности основных положений и выводов диссертационная работа Д.А. Ланшакова отвечает требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает присуждения ему ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.01 – физиология.

Зав. лабораторией эндокринологии  
ФГБУ «Научный центр клинической  
и экспериментальной медицины»  
Сибирского отделения РАМН,  
доктор биологических наук,  
профессор



Селятицкая В.Г.

