

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертацию МУЗЫКА Владимира Владимировича «Влияние глюкокортикоидов и гипоксии на ключевые белки апоптоза и их регуляторы в мозге неонатальных крыс», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности

03.03.01 - физиология

Актуальность проблемы

Известно, что в развивающемся мозге млекопитающих протекают как процессы пролиферации нервных клеток, так и физиологической элиминации избыточного количества закладывающихся нервных клеток. Последняя осуществляется посредством митохондриального (внутриклеточного) апоптоза с участием каспазы-3. За индукцию апоптоза ответственен сдвиг в балансе регуляторных антиапоптозных и проапоптозных белков семейства Bcl-2 в сторону экспрессии генов проапоптозных белков. К настоящему времени исследовано содержание отдельных белков, участвующих в регуляции апоптоза, в отделах формирующегося головного мозга млекопитающих. Однако отсутствуют какие-либо сведения об особенностях экспрессии генов ключевых белков апоптозного каскада и их возможной взаимосвязи.

Важнейшими факторами, влияющими на баланс экспрессии генов антиапоптозных и проапоптозных белков семейства Bcl-2, являются зрелая и незрелая формы мозгового нейротрофического фактора (BDNF), а также, предположительно, глюкокортикоиды, участвующие в реализации стрессорного ответа организма. Действие глюкокортикоидов в наибольшей степени проявляется в критические периоды раннего онтогенеза, когда мозг наиболее чувствителен к действию стресса. В частности, показано, что индуцируемое стрессом повышение уровня этих гормонов в крови в раннем онтогенезе может оказывать как нейропротекторное действие, так и необратимо влиять на морфологию головного мозга, и приводить к последующим долговременным изменениям поведения и психики. Однако прямых доказательств участия глюкокортикоидов в регуляции апоптоза в формирующемся головном мозге нет. Выяснение этого вопроса представляется важным, поскольку глюкокортикоиды и их синтетические аналоги используются в перинатальной медицине для коррекции патологических состояний, связанных с недоразвитием лёгких и последующей асфиксией новорожденного и приводящих к негативному воздействию на развивающийся мозг.

В этой связи, диссертационная работа Музыка В.В., посвящённая выяснению влияния глюкокортикоидов и гипоксии и их сочетанного действия на экспрессию белков апоптозного каскада в отделах мозга неонатальных крысят и изучению особенностей экспрессии ключевых белков апоптозного каскада и форм BDNF в этих отделах мозга, является, несомненно, актуальным исследованием.

Обоснованность и достоверность полученных результатов и выводов диссертации.

Диссертационная работа Музыка В.В. представляет собой большое по объёму исследование, с использованием методов работы с лабораторными животными, физиологических методов, включающих моделирование гипоксического состояния у животных и оценку катоболического эффекта вводимых гормонов, а также анатомических методов получения тканей различных отделов мозга 3-х и 8-ми дневных крысят. Проведение работ, связанных с получением различных отделов мозга: продолговатого мозга, области моста, мозжечка, фронтальной коры и гиппокампа потребовало от соискателя применения тончайшей микрохирургической операционной техники.

Основная часть работы выполнена с использованием современных молекулярно-биологических методов. Выделение и очистку нативного препарата РНК и синтез кДНК диссертант проводил по стандартным методикам. Количественный анализ изменения содержания мРНК белка Bcl-XL в стволе мозга 3-дневных крысят был проведен методом ПЦР в реальном времени (real-time PCR) с использованием наборов TaqMan® Gene Expression Assays на амплификаторе AB Prism 7000 (“Applied Biosystems”, США). Все определения количества кДНК в каждом образце проводились в 2-х – 3-х повторах. Коэффициент вариации для одной пробы составлял менее 3%, корреляция между повторными определениями достигала 0.99. В качестве контрольных образцов использовались различные концентрации мРНК β -актина. Используемая диссертантом технология позволила достичь высокой степени воспроизводимости полученных результатов и высокой точности определения концентрации мРНК белка Bcl-XL в образцах.

Используемые в работе дозы гормональных препаратов соответствовали применяемым как в клинической практике перинатальной медицины, так и в экспериментальных работах других исследователей.

В сериях экспериментов, связанных с определением относительных количеств исследуемых белков (GR, Bcl-XL, Вах, каспазы-3, mat-BDNF и pro-BDNF) в образцах из различных отделов мозга, при выделении суммарного препарата белка соискатель использовал смесь мощных ингибиторов протеаз различных классов и специфичности: апротинина - поливалентного ингибитора протеаз, леупептина - ингибитора сериновых и цистеиновых протеаз и пепстатина А - ингибитора кислых протеаз. Применение коктейля ингибиторов протеаз позволяет с уверенностью гарантировать нативность выделенных препаратов белков. Оценку содержания целевых белков (Bcl-XL, Вах, активной и интактной каспазы-3, mat-BDNF и pro-BDNF) соискатель производил путем компьютерной денситометрии мембран иммуноблотов, содержащих разделенный одномерным денатурирующим гелем электрофорезом суммарный белок. Предварительно было показано, что при использовании этого метода для β -актина и исследованных белков соблюдается линейная зависимость между уровнем сигнала и количеством белка.

Результаты исследований подвергались статистической обработке с использованием пакета статистических программ Statistica 6.0.

На основе применения различных методов анализа соискателем были получены оригинальные данные, касающиеся особенностей экспрессии генов ключевых белков апоптозного каскада в различных отделах мозга неонатальных крысят, а также отдельного и сочетанного влияния глюкокортикоидов и гипоксии на экспрессию этих генов.

Всё изложенное позволяет говорить о высоком профессиональном и методическом уровне исследования. Большой объем экспериментального материала, применение многопланового подхода, использование современных высокоинформативных методов исследований и теоретическое обобщение полученных данных, позволили соискателю сформулировать основные научные положения и выводы диссертационной работы, объективность и высокая степень достоверности которых не вызывает сомнений.

Научная новизна. Соискателем впервые выявлена взаимосвязь экспрессии генов ключевых анти- и проапоптозных белков в гиппокампе неонатальных животных, и отсутствие подобной сопряженности в стволе мозга. Также впервые установлена обратная зависимость между отношением mat-BDNF/pro-BDNF и содержанием активной каспазы-3 в отделах мозга неонатальных животных на 8-ой день жизни.

Впервые установлена способность гипоксии и глюкокортикоидов изменять уровни белков апоптоза в развивающемся головном мозге. В частности, продемонстрирован антиапоптозный эффект гидрокортизона на экспрессию генов ключевых белков апоптоза и форм BDNF в гиппокампе неонатальных животных. Впервые доказан проапоптозный эффект постгипоксического применения дексаметазона, тогда как предгипоксическое его применение не приводит к изменениям содержания ключевых белков апоптоза.

В результате выполнения диссертационной работы соискателем получены принципиально новые данные, касающиеся экспрессии генов ключевых белков апоптозного каскада в отделах мозга неонатальных крысят.

Теоретическая и практическая значимость диссертационной работы высокая. Полученные соискателем новые данные, имея фундаментальный характер, вносят существенный вклад в изучение регуляции численности нервных клеток в мозге млекопитающих на ранних стадиях онтогенеза с участием в этом процессе физиологического апоптоза.

Использованные диссертантом методы и подходы изучения экспрессии генов белков апоптозного каскада в отделах мозга могут быть использованы в аналогичных работах других исследователей. Полученные в диссертационной работе новые сведения о влиянии предгипоксического и постгипоксического введения глюкокортикоидов на экспрессию генов анти- и проапоптозных белков могут оказаться полезными для практического использования в перинатальной медицине для коррекции патологических состояний, связанных с недоразвитием лёгких и последующей асфиксией плода. Материалы диссертации целесообразно включить в соответствующие курсы лекций для студентов ВУЗов, врачей факультетов усовершенствований последипломного образования.

Общая характеристика работы.

Диссертационная работа Музыка В.В. изложена на 131 странице машинописного текста, имеет традиционную структуру, состоит из введения, обзора литературы, главы с описанием материала и методов исследования, результатов собственных исследований, главы обсуждения результатов, выводов и библиографического списка, включающего 227 источника, в том числе 224 работы зарубежных авторов. Содержание диссертации характеризуется четким, последовательным изложением, текст работы отлично проиллюстрирован 23 рисунками. Количественные данные представлены в 7-ми таблицах. Результаты исследования достаточно полно апробированы, докладывались на 2-х международных научных студенческих конференциях, 3-х съездах физиологов России и на 5-ой Всероссийской научно-практической конференции с международным участием.

По материалам диссертации опубликовано 10 научных работ, включая 3 статьи в журналах, рекомендованных ВАК для публикации результатов диссертационных исследований. Характеризуя работу в целом можно утверждать, что цель работы и задачи исследования глубоко продуманы и научно обоснованы. Поставленные соискателем задачи были полностью выполнены, результаты, полученные с помощью современных методов исследования и статистически обработанные, являются достоверными. Выводы и положения, выносимые на защиту, полностью соответствуют полученным результатам. Содержание автореферата соответствует основным положениям диссертации. Все это позволяет высоко оценить диссертационное исследование Музыки В.В.

Принципиальных замечаний по существу диссертационной работы нет, хотя имеются замечания по оформлению работы. В частности, в тексте диссертации часто встречаются выражения:

- «экспрессия белка», «экспрессия нейротрофинов ...» и т.п., тогда как более корректно говорить об экспрессии генов соответствующих белков;
- «уровень белков ...», «уровень каспазы-3 ...», «уровень мРНК» и т.п., тогда как более правильно говорить о количестве (концентрации или содержании) этих макромолекул.

В целом же работа ясно изложена, написана, без грамматических и стилистических ошибок, хотя изредка в тексте встречаются опечатки.

В дискуссионном плане предлагаю следующие вопросы:

1. Почему для количественного определения исследуемых анти- и проапоптозных белков в диссертационной работе используется трудоёмкий в исполнении и менее точный метод компьютерного сканирования иммуноблотов, а не твердофазный иммуноферментный анализ?
2. Почему определение количества специфической мРНК ограничивалось в работе только для антиапоптозного белка Bcl-XL и не проводилось для определения содержания мРНК белков Вах и BDNF?
3. С чем связаны различия в соотношении mat-BDNF к pro-BDNF в различных отделах мозга 8-ми дневных крысят и почему именно соотношения между этими формами

нейротрофического фактора, но не каждая из форм в отдельности проявляют взаимосвязи с содержанием активной каспазы-3?

Заключение

Таким образом, кандидатская диссертация Музыка В.В. «Влияние глюкокортикоидов и гипоксии на ключевые белки апоптоза и их регуляторы в мозге неонатальных крыс» является законченной научной квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований сформулированы теоретические положения, совокупность которых можно квалифицировать как новое крупное достижение в нейробиологии – в изучении особенностей регуляции физиологического апоптоза в отделах мозга млекопитающих на ранних стадиях онтогенеза.

Диссертационная работа по актуальности изучаемой проблемы, степени научной новизны, теоретической и практической значимости, обоснованности научных положений и выводов, полноте публикаций материалов в научных печатных изданиях, соответствует требованиям ВАК РФ, предъявляемым к кандидатским диссертациям, критериям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» (постановление Правительства РФ №842 от 24.09.2013 г.), а ее автор Музыка Владимир Владимирович заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.01 – физиология.

Официальный оппонент:

Зав.лабораторией генной инженерии
ФГБУ «НИИ БХ» СО РАМН
доктор биологических наук, профессор
Беклемишев Анатолий Борисович.
630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2
beklem@niibch.ru
02.06.2014

