

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Фурсенко Дарии Дмитриевны «ВЛИЯНИЕ НОКАУТА ГЕНА ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛИ НА ЦЕНТРАЛЬНУЮ НЕРВНУЮ СИСТЕМУ И ПОВЕДЕНИЕ МЫШЕЙ», представленную в диссертационный совет Д 001.014.01 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт физиологии и фундаментальной медицины» к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.01– физиология

Диссертационное исследование Дарии Дмитриевны Фурсенко посвящено влиянию фактора некроза опухоли (TNF) на поведение и физиологию центральной нервной системы у мышей. Фактор некроза опухоли является важным провоспалительным цитокином, участвующим в регуляции неспецифического иммунного ответа и в нейро-иммунном взаимодействии. Известно его влияние на центральную нервную систему, в частности на поведение и регуляцию нейрогенеза в эмбриональном, раннем постнатальном и взрослом состояниях. Исследование эффектов TNF проводят на нокаутных по гену *Tnf* линиях. Однако, несмотря на большое количество таких исследований, данные трудны для сопоставления по разным причинам. Одна из них – недостатки самих моделей нокаута, полученных методом замещения участка гена *Tnf* на ген устойчивости к неомицину *neo^r*, который может влиять на экспрессию близлежащих генов, кодирующих $LT\alpha$ и $LT\beta$, также относящихся к семейству TNF. Наиболее адекватной моделью является новая линия с нокаутом гена *Tnf*, полученная российскими учеными методом Cre/loxP рекомбинации, при котором удаляется и участок гена, и ген устойчивости к неомицину. Именно эта линия и была выбрана Дарией Дмитриевной в качестве объекта исследования влияния дефицита TNF на центральную нервную систему и поведение мышей. Работа была проведена в Центре генетических ресурсов

лабораторных животных ФГБУН «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН».

Диссертация, изложенная на 93 страницах, состоит из вводной части, четырех глав, заключения, выводов, списка литературы и приложения с таблицами. Список цитированных источников включает 255 наименований, главным образом англоязычных. В работе содержится 9 рисунков и 21 таблица.

Во вводной части обоснована актуальность диссертационной работы, сформулирована ее цель – изучить влияние недостатка TNF на поведение, морфологию и серотониновую систему головного мозга, возрастные изменения этих характеристик у созданной российскими учеными линии мышей с нокаутом гена *Tnf*. Определены конкретные задачи исследования, показаны его научная новизна, а также теоретическое и практическое значение полученных результатов.

В главе 1, озаглавленной «Обзор литературы. Роль фактора некроза опухоли в нервной системе и в регуляции поведения» подробно описан фактор некроза опухоли TNF, особенности строения и функционирования его рецепторов, сигнальные пути TNF, и его действие в центральной нервной системе в норме и при патологии, в том числе при регуляции состояний сна и бодрствования, подробно описано взаимодействие TNF с серотониновой системой мозга. Отдельный раздел главы посвящен обзору поведенческих особенностей, биохимических и морфологических изменений мозга у мышей с нокаутом гена *Tnf*. Обзор написан очень продуманно и тщательно, его логическое завершение - сформулированные автором вопросы, которые являются задачами данного исследования.

Глава 2 посвящена материалам и методам исследования. Объектами исследования были самцы мышей с нокаутом гена *Tnf* (KO) и мыши линии C57Bl/6 (WT) в возрасте 2 и 4 месяцев. Для типирования поведения животных были применены следующие тесты: «открытое поле», «приподнятый крестообразный лабиринт», «принудительное плавание»,

«щипковая каталепсия», «водный лабиринт Морриса». Стоит отметить, что тестирование поведения проведено с помощью оригинальной разработки лаборатории, в которой выполнено исследование - программно-аппаратного комплекса EthoStudio. Морфологические особенности мозга *in vivo* исследовали с помощью магнитно-резонансной томографии. Для нейрохимических исследований применена высокоэффективная жидкостная хроматография, концентрации белка определялись методом Бредфорда. Выбранные методы исследования отвечают поставленным задачам.

Главы 3 и 4 посвящены полученным результатам и их трактовке. Стоит отметить, что различий по потреблению пищи и воды у двух линий мышей обнаружено не было. Это дает основание считать, что различия в поведении, обнаруженные в тестах, не связаны с питанием.

Были обнаружены достоверные различия в длительности сна: у мышей линии КО средняя продолжительность сна была меньше, чем WT, но среднее число эпизодов сна у них больше. Это подтверждает сомногенное действие TNF. Различий в двигательной активности в домашней клетке и тестах «открытое поле» и «приподнятый крестообразный лабиринт» обнаружено не было. Интересные результаты были получены автором при исследовании тревожности и эмоциональности животных. Мыши линии КО проводили больше времени в центре «открытого поля», чем мыши WT. При этом двухмесячные мыши КО более активно исследуют центр поля (автор сравнивала площадь исследуемой территории), чем мыши WT. Можно было бы сделать вывод о том, что мыши КО менее тревожны, чем WT. Однако, в приподнятом крестообразном лабиринте площадь исследованного открытого рукава у них меньше. Автор объясняет обнаруженный результат меньшей стрессогенностью открытого поля, так как освещенность центральной его части такая же как и домашней клетки. Однако, в отличие от домашней клетки, «открытое поле» – новое неизвестное для животного пространство, в нем нет следов собственного пребывания, и следовательно, оно потенциально для него опасно, поэтому, на мой взгляд, это объяснение не является

достаточным. При сравнении поведения в «открытом поле» и «приподнятом крестообразном лабиринте» необходимо учитывать, что животные с одной стороны мотивированы исследовать новое пространство, а с другой – оно представляется им опасным. При проведении теста «открытое поле» животное помещалось у стенки арены – в безопасной части. Животное может либо *оставаться* в безопасной периферии, либо выходить в центральную часть арены. Если животные выходят исследовать центральную часть, можно считать, что у них «побеждает» исследовательская мотивация. В «приподнятом крестообразном лабиринте» животное помещали в место пересечения открытого и закрытого рукавов. Чтобы попасть в безопасное пространство, животное должно сменить месторасположение, то есть оно не может остаться в безопасности там, куда его поместили. В том числе и поэтому данный тест считается более стрессогенным: животному надо обязательно решить, куда двигаться, чтобы быть в безопасности.

С помощью теста «принудительное плавание» показан антидепрессантный эффект нокаута гена *Tnf*, который также сопряжен с повышенным уровнем серотонина в коре и гиппокампе у четырехмесячных мышей КО.

В тесте «водный лабиринт Морриса» обе линии одинаково хорошо обучались находить скрытую платформу. Любопытный результат был получен в тесте «щипковая каталепсия». Оказалось, что среди двухмесячных мышей КО 46% демонстрировали каталептическую реакцию, в то время как мыши WT не замирали ни разу. При этом у четырехмесячных мышей КО каталептическая реакция пропадала. Автор связывает это с размером гипофиза, который в двухмесячном возрасте у мышей КО меньше, чем у мышей WT. При этом размер гипофиза, вероятно, связан с изменением темпов формирования отделов мозга у мышей КО, а не с наличием у них патологических состояний

Представленный в диссертации объемный экспериментальный материал получен с применением современных методических подходов в

области изучения поведения. Следует отметить высокую степень достоверности полученных результатов, выявленную с использованием адекватных статистических методов.

Заключение и выводы, сделанные соискателем, конкретны, содержательны и находятся в соответствии с поставленными задачами. Автором работы выдержаны все формальные и содержательные требования к кандидатским квалификационным работам. Структура и объем диссертации традиционны. Работа апробирована на нескольких российских и международных конференциях. Материалы диссертации опубликованы в ведущих научных журналах.

Принципиальных замечаний нет.

Заключение: Диссертационная работа Фурсенко Д.Д.: «Влияние нокаута гена фактора некроза опухоли на центральную нервную систему и поведение мышей», представленная к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук в специализированный диссертационный совет Д003 Д 001.014.01 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт физиологии и фундаментальной медицины» по специальности 03.03.01– физиология является законченной научно-квалификационной работой. Содержит оригинальные результаты в области физиологических и поведенческих исследований. Статистический анализ полученных результатов проведен корректно. Выводы обоснованы. По актуальности, объему выполненных исследований, научной новизне, методическому уровню и научной значимости полученных результатов диссертационная работа Д.Д. Фурсенко полностью соответствует требованиям Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а автор заслуживает

присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.01 – физиология.

Старший научный сотрудник лаборатории поведенческой экологии сообществ ФГБУН Институт систематики и экологии животных Сибирского отделения Российской академии наук,
кандидат биологических наук

С.Н.
С.Н. Пантелеева



Подпись *Пантелеева С.Н.*
заверяю *Михантьева Н.К.* Михантьева Н.К.

14.09.2017