



**МОСКОВСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ  
УНИВЕРСИТЕТ  
имени М.В.ЛОМОНОСОВА  
(МГУ)**

Ленинские горы, Москва, ГСП-1, 119991  
Тел.: 939-10-00, Факс: 939-01-26

04.09.2017 № 916-17/013-03  
На № \_\_\_\_\_

Утверждаю  
Проректор –  
начальник Управления научной  
политики и организации научных  
исследований

МГУ имени М. В. Ломоносова  
А.А. Федянин

1/ix 2017



### ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертационную работу Фурсенко Дарии Викторовны на тему: **ВЛИЯНИЕ НОКАУТА ГЕНА ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛИ НА ЦЕНТРАЛЬНУЮ НЕРВНУЮ СИСТЕМУ И ПОВЕДЕНИЕ МЫШЕЙ**», представленную для соискания ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.01 – физиология

Работа Д.В. Фурсенко посвящена анализу изменений поведения мышей с выключенным геном *tnf*, в которой проведено исследование обучаемости, памяти, тревожности, двигательной активности, а также размеров отдельных структур головного мозга и состояние серотонинергической системы мышей с нокаутом гена *tnf*, полученного по иной, чем ранее, технологии. Провоспалительный цитокин TNF (наряду с другими цитокинами и мозговыми факторами) привлекает внимание исследователей, поскольку его можно рассматривать как элемент «связующего звена» между иммунной и нервной системой. Значение анализа таких взаимодействий (и общетеоретическое, и медицинское) нельзя переоценить. Автор справедливо отмечает важность психонейроиммунологии как

междисциплинарной области, изучающей пути влияния психических процессов на функцию иммунной системы, и механизмы воздействия процессов в иммунной системе на функцию ЦНС. Именно второму аспекту этой проблемы и посвящена диссертационная работа Д.В. Фурсенко.

Как известно, в нормальных условиях течение воспалительного процесса, в котором участвует TNF, сопровождается общими изменениями в организме – и в общем уровне активности, и в эмоциональной сфере, составляющими в целом «sickness behavior». Блокаторы TNF (и его рецепторы) уже вошли в список фармакологических препаратов, которые используются для лечения ряда аутоиммунных заболеваний, что свидетельствует о важной роли этого цитокина. Однако подавление иммунитета при таких вмешательствах является серьезной медицинской проблемой, и в связи с этим подробное исследование влияния TNF на иные, чем иммунный ответ, функции организма (чему посвящена данная диссертация) представляется актуальной проблемой нейробиологии.

Известно, что животные, несущие нокаут того или иного гена, – удобная модель для изучения функций соответствующих белков и/или регуляторных факторов, однако на этом пути существует ряд объективных трудностей, связанных с собственно технологией получения мутаций, с использованием генно-инженерных методов. Это относится, как справедливо отмечает автор диссертации, и к получению нокаутов гена TNF. Не вдаваясь в подробности, отметим, что существование возможных различий в изменениях функции ЦНС при нокаутах TNF, полученных разными способами, послужили одной из причин необходимости выполнения данной работы.

Целью работы была характеристика функций ЦНС у мышей новой линии с нокаутом гена *Tnf*, в сопоставлении с животными дикого типа, а также выявление возможного влияния возраста животных на проявление последствий данной мутации.

Эта цель заставила исследователя сформулировать конкретные задачи работы, которые заключались в следующем. Это было проведение сравнения

поведения мышей этих двух групп и двух возрастов (двигательная активность, потребление пищи и воды, продолжительность сна, тревожность, предрасположенность к депрессии, обучаемость, каталептические реакции, состояние серотониновой системы мозга), а также сравнение размера некоторых структур мозга (методом магнито-резонансной томографии).

Очевидно, что получение четких экспериментальных данных в соответствии с задачами данной работы - это важная информация и для выяснения конкретной роли данного цитокина *per se* (и составления паспорта данной линии), и для оценки роли технологии получения нокаутов разными способами, поскольку эта (возникшая не сегодня) проблема важна для использования экспериментальных материалов по нокаутам в медицине. Это означает, что работа Д.В. Фурсенко, в которой получен ряд важных новых сведений о роли TNF в функции ЦНС, важна и актуальна и в практическом, и в теоретическом аспектах.

Диссертация изложена на 93 страницах, содержит 9 оригинальных рисунков и 21 таблицу. Она включает следующие разделы - введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение, список цитируемой литературы (255 источников) и приложение.

Полученные в работе данные показывают, что выключение гена данного цитокина не вызывает изменений в уровне двигательной активности животных, а также в процессах, связанных с формированием навыков избегания в модифицированном тесте Морриса. Полученные данные позволяют предположить, что выключение гена TNF сопряжено с изменением темпов развития ЦНС, с возможным изменением цикла «сон-бодрствование» и с изменениями в метаболизме серотонина.

Опыты проводились на самцах мышей с нокаутом по фактору некроза опухоли (KO), созданных с участием российских ученых (Kuprash et al., 2005).

Во введении автор формулирует общую проблему исследования, опираясь на существующие представления о связи между иммунной и нервной системами организма и о роли в этом «системы регуляции

воспаления», в частности с участием цитокинов. Актуальность выполнения исследования, поставленного перед автором, в этом разделе диссертации хорошо аргументирована.

Обзор литературы, изложенный на 27 страницах, содержит 7 подразделов, в которых дается лаконичная, но информативная сводка данных по следующим проблемам. Описываются данные по роли фактора некроза опухоли, его рецепторной системы, а также «апоптотических» и «не-апоптотических» сигнальных путей, которые известны в настоящее время. Этот раздел написан очень четко и адекватно проиллюстрирован структурными схемами. Приводятся данные о влиянии TNF на синаптическую передачу (экзоцитоз AMPAR и эндоцитоз ГАМК<sub>A</sub>), а также на процессы клеточной пролиферации в мозге как в период эмбрионального развития, так и в постнатальный период. Подробно приводится научная литература о влиянии TNF (при разных способах введения) на систему регуляции сна, а также об особенностях этой системы у животных с «генно-инженерно» измененной системой TNF и его рецепторов. Следует отметить, что совокупность приведенных сведений в целом не может быть свидетельством «сомногенных» эффектов TNF, как это заключает автор, поскольку этот цитокин участвует во многих процессах, и, в целом, говорить о его конкретном влиянии на систему регуляции сна не достаточно обосновано. Это подтверждает и добротная литературная сводка (раздел 1.4.4), посвященная описанию данных об участии TNF в формировании «синдрома больного» (sickness behavior).

Не только «синдром больного» (как адекватная реакция организма на внешние вредоносные воздействия), но и патологические состояния ЦНС (рассеянный склероз, болезни Паркинсона и Альцгеймера) включают в свой патогенез механизм регуляции системы TNF. Автор приводит много данных, свидетельствующих об этих проблемах, но, к сожалению, не приводит собственной точки зрения на этот вопрос (хотя разнообразие

данных можно трактовать как свидетельство участия этого цитокина в общих звеньях механизмов развития таких состояний).

Специальное внимание в обзоре литературы автор уделяет влиянию TNF на серотониновую систему – после краткого и квалифицированного обзора серотонинергической системы мозга дается оценка связи уровня TNF и 5-НТ. Основной вывод из этого краткого обзора - фактор некроза опухоли может влиять на уровень серотонина в мозге через регуляцию транспортера серотонина.

Отдельный раздел обзора литературы посвящен подробному описанию особенностей поведения животных с выключенным геном TNF. Автор показывает, что в трех линиях из пяти описанных в литературе при получении нокаута участок гена *Tnf* был заменен на ген устойчивости к неомицину, что могло привести к артефактам в оценке эффектов собственно нокаута из-за особенностей экспрессии близлежащих генов. Автор дает сводную таблицу особенностей «строения» полученных нокаутных линий, что показывает хорошее знакомство с технологией получения таких животных.

Хотя исследований с использованием данных нокаутов очень много, исследований собственно поведения животных значительно меньше. В обзоре подробно (даже несколько слишком детализировано) описываются особенности поведения таких мышей, а основные результаты этих работ удачно сведены в таблицу. Подробные сведения о поведении мышей с выключенным геном *tnf*, а также об особенностях биохимии их мозга, заставляют автора сделать вывод о неполноте описания особенностей поведения таких животных, и необходимости получения новой информации.

В обосновании этого вывода специальный подраздел обзора посвящен описанию особенностей нокаута гена *tnf*, на котором были проведены эксперименты, составившие диссертацию. А это, в свою очередь, показывает обоснованность основных задач диссертации.

В целом обзор литературы, посвященный столь сложному вопросу, как эффекты выключения гена фактора некроза опухолей, написан лаконично, но квалифицированно и заслуживает быть опубликованным. Из недочетов следовало бы отметить некое ненужное «словотворчество» автора, в виде руссифицированных названий структур мозга (например, бугорнососцевидные ядра, ножкомостовое ядро), которые никогда не используются.

Раздел, в котором описываются использованные методы, занимает 6 страниц и содержит практически всю необходимую информацию о проводившихся экспериментах. К сожалению, в этом разделе не указано общее число животных, использованных в работе (хотя при описании экспериментальных данных число животных почти всюду четко указано). Кроме того не приводятся сведения о последовательности проведения тестов (если при этом использовались одни и те же животные), что важно с точки зрения возможного влияния предыдущего теста на результаты последующего тестирования.

Животные, которые были использованы в работе, имели *spf* статус и содержались в индивидуально вентилируемых клетках. Этот момент имеет принципиальное значение, поскольку показано, что содержание в таких клетках видоизменяет поведение животных по сравнению с теми, которых держали в обычных клетках. К сожалению, ни в этом разделе, ни в дальнейшем не упоминается, в каких условиях проводили исследования авторы работ по другим нокаутам этого гена, а также в каких условиях содержались животные, данные по которым были получены ранее в разделе по нейрохимическим особенностям серотониновой системы. Известно, что *spf* условия радикально затрагивают состав кишечной микрофлоры, а также ее взаимодействия с иммунной системой организма. Эти вопросы, которые встают перед исследователями в связи с новыми условиями работы с животными, следует обязательно рассматривать и анализировать.

Периоды относительной неподвижности мышей, зафиксированные автоматической системой, автором условно принимались за периоды сна. Это вполне разумное допущение, поскольку четкие, однозначные свидетельства наличия у животного состояния сна, можно получить только методом ЭЭГ, а таких экспериментов не проводилось. Однако подобное «косвенное» свидетельство развития у животных сна далее в работе трактуется, как прямое доказательство состояния сна, что выглядит не достаточно строго.

Еще одно замечание по этому разделу работы следует сделать относительно наименования плоскостей виртуальных срезов мозга в экспериментах по MRI. По использованной автором терминологии, горизонтальная плоскость (как она рассматривается в нейроморфологии) именуется фронтальной, а фронтальная – аксиальной. Это недоразумение может быть связано со спецификой терминологии при MRI мозга человека, но использование ее в данной работе вызывает недоумение.

Раздел «Результаты» занимает 16 страниц, основные результаты сведены в таблицы, а также проиллюстрированы графиками.

Отправной точкой исследований по диссертационной теме была необходимость анализа поведения и ряда других характеристик ЦНС мышей с нокаутом гена *tnf*, полученного в работе Caprash et al., 2005, в которой технология выключения функции гена была иной, чем в других случаях. К сожалению краткого резюме результатов, полученных в каждой из серий опытов, автор не приводит, что затрудняет восприятие полученных результатов.

Показано, что нокаут этого гена не влиял на потребление воды и пищи мышами 2 и 4-мес возраста (но не указаны величины среднего веса животных каждого генотипа), как не влиял он и на общий уровень двигательной активности в домашней клетке, хотя мыши с КО обоих возрастов были несколько более активными в период смены освещения. Не

указано, к сожалению, были ли это одни и те же животные, тестированные в разные периоды жизни, или это были разные группы мышей.

Число эпизодов сна и общая длительность сна были, в целом, одинаковыми у мышей двух генотипов, однако показатели сна были выше у мышей дикого типа. В целом картина соответствовала различиям в общем уровне активности. Автору следовало бы также проанализировать возможные особенности восприятия обонятельных сигналов у животных-нокаутов.

Неоднозначные результаты были получены в работе в экспериментах, оценивающих тревожность мышей. Мыши с КО обоих возрастов больше времени проводили в центре арены «открытого поля» (что трактуется как проявление невысокой тревожности). В то же время такой (пока мало используемый) показатель поведения в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт. ПКЛ», как исследованная площадь открытого рукава была у них меньше. Автор, к сожалению, не приводит ссылок на работы (например, A. Ennaceur), в которых критически рассматривается неоднозначная информативность теста ПКЛ, а приводимые автором объяснения обнаруженных различий выглядят достаточно умозрительными.

В работе Д.В. Фурсенко были также проведены эксперименты по сравнению размеров некоторых структур мозга у мышей дикого типа и нокаутов. Было обнаружено, что у 2 мес. мышей размер гипофиза у КО был меньше, по сравнению с размером этой структуры у мышей дикого типа, однако в 4 мес. возрасте эти различия сгладились.

Изменения в серотонинергической системе мозга. обнаруженные у 4 мес. мышей с КО также показывают роль TNF в функции ЦНС, однако и малые размеры выборки, и использование только одного метода оценки размера структуры не позволяют, на наш взгляд, быть столь категоричными в заключении о роли измененного гормонального фона в генезе обнаруженных различий.

Можно согласиться с предположением автора, что роль гена *tnf* может быть связана с процессами развития мозга, поскольку и ккательепсия, которая была обнаружена у КО-мышей в 2 мес возрасте, не обнаруживалась далее у более взрослых животных.

Полученные автором результаты показывают, на примере TNF, сложность взаимодействий иммунной и нервной систем организма. Как любое тщательно выполненное исследование, данная диссертационная работа показывает направления возможных будущих сравнительных исследований.

Следует заключить, что диссертация Д.В. Фурсенко – это законченное исследование, полученные в ней результаты и основанные на них выводы обоснованы и квалифицированно сопоставлены с существующими данными по этой проблеме.

Используя разнообразные экспериментальные подходы, автор продемонстрировала выявленные эффекты выключения гена *tnf*. Поскольку выключение этого гена было проведено по иному, нежели в других исследованиях, методу, полученные данные имеют и теоретическую, и практическую значимость.

Отмеченные в отзыве недостатки работы не влияют на ее общую высокую положительную оценку. Автореферат соответствует содержанию диссертации.

По теме диссертации опубликовано 6 работ, из них 3 статьи в рецензируемых отечественных (2) и международных (1) журналах, 3 тезисов на всероссийских (1) и на международных конференциях (2).

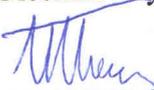
Тщательный анализ диссертационной работы Д.В. Фурсенко на тему: «Влияние нокаута гена фактора некроза опухоли на центральную нервную систему и поведение мышей» позволяет заключить, что работа соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, в том числе критериям, установленным «Положением о присуждении ученых степеней» от 24.09.2013 № 842, а автор, Д.В. Фурсенко, достойна

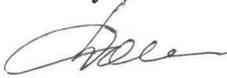
присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.01  
Физиология.

Отзыв утвержден на заседании кафедры высшей нервной деятельности  
Биологического ф-та МГУ имени М.В. Ломоносова 1.09 2017 г, протокол № 6

Сведения о ведущей организации:

1. Полное наименование: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»
2. Сокращенное наименование: Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, МГУ имени М.В. Ломоносова, или МГУ
3. Почтовый адрес: 119234, г. Москва, ГСП-1, Ленинские горы, д. 1
4. Юридический адрес: 119991, г. Москва, Ленинские горы, д. 1
5. Телефон (495) 939-27-29, Email: info@rector.msu.ru

Ведущий научный сотрудник, доктор биологических наук, звание - старший научный  
сотрудник,  Полетаева И.И.

Ученый секретарь кафедры высшей нервной деятельности Биологического ф-та МГУ  
имени М.В. Ломоносова, доктор биологических наук,  
профессор  Данилова Р.А.

Заведующий кафедрой высшей нервной деятельности, доктор биологических наук,  
профессор  Латанов А.В.

