

«УТВЕРЖДАЮ»

Ректор Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Омский государственный аграрный университет имени П.А. Столыпина», доктор экономических наук, профессор Шумакова Оксана Викторовна

« 09 / 04 2021 г.



ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Омский государственный аграрный университет имени П.А. Столыпина» на диссертационную работу *Кириченко Евгении Юрьевны* на тему *«Роль щелевых контактов и белков-коннексинов в нейро-глиальных и нейро-глио-васкулярных взаимодействиях в таламокортикальной системе мозга крыс»*, представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 06.02.01 – диагностика болезней и терапия животных, патология, онкология и морфология животных в диссертационный совет Д 220.062.02 при ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный аграрный университет»

Актуальность избранной темы. Представленная диссертационная работа посвящена изучению роли щелевых контактов и белков-коннексинов в нейро-нейрональных, нейро-глиальных и нейро-глио-васкулярных взаимодействиях в таламокортикальной системе мозга крыс.

Актуальность темы определяется с одной стороны – острой необходимостью изучения механизмов регуляции различных патологий ЦНС, включая прионные заболевания и нейроканцерогенез, для последующей разработки эффективных средств фармакокоррекции через воздействие на рецепторы щелевых каналов, с другой – для выявления новых эффективных показателей диагностики, а также определения прогноза развития первичных глиальных опухолей головного мозга млекопитающих. Следует отметить, что важное значение для разработки стратегий, позволяющих осуществлять контролируемую доставку лекарственных веществ в клетки ЦНС, является определение функционального состояния щелевых контактов, входящих в состав гематоэнцефалического барьера.

Сегодня очевидно, что для решения многих прикладных вопросов патогенеза и фармакокоррекции нейродегенеративных заболеваний требуются глубокие познания фундаментальных основ межнейронной взаимосвязи. Доказано, что формирование щелевых каналов, непосредственно соединяющих цитоплазму двух клеток, позволяют им, обмениваясь небольшими молекулами, координировать широкий круг действий, а именно – синхронизировать клеточную активность посредством распространения автоволновых процессов, участвовать в создании клеточной сети с распределенными ресурсами, а также в индукции и модуляции клеточной активности, кроме того щелевые контакты могут быть использованы для маршрутизации сигналов по клеточной сети. Несмотря на высокий интерес к изучению щелевых контактов головного мозга млекопитающих, в том числе при многих заболеваниях ЦНС, их распределение и роль в межклеточном взаимодействии неокортекса и таламуса остаются малоизученными вопросами. Изучение вопросов о взаимном расположении химических синапсов и глиальных щелевых контактов внутри корковых и подкорковых таламических модулей, в составе нейро-глиососудистых ансамблей, количественном распределении глиальных и нейрональных щелевых контактов, а также изучение характеристик экспрессии коннексинов в корковых и подкорковых структурах, и типов электрических синапсов в колонках коры головного мозга, является фундаментальной задачей, решение которой открывает новое научное направление в медицине.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. Высокая степень обоснованности и достоверности результатов исследования, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертационной работе Е.Ю. Кириченко, подтверждается грамотно обоснованными методическими подходами при организации работы, продуманным дизайном исследования, достаточным по объему исследования фактическим материалом, использованием современных гистологических и иммуногистохимических, иммунофлюоресцентных, электронномикроскопических, иммуноэлектронномикроскопических и морфометрических методов исследования на светооптическом и ультраструктурном уровнях с применением сертифицированного модуля интерактивных измерений (LAS Interactive

Measurement) и лицензионных программ, обоснованным выводам и рекомендациям. Научные положения обеспечиваются глубоким анализом тематических публикаций отечественных и зарубежных ученых. Для обработки полученных результатов использованы статистические методы, адекватные поставленной цели и задачам. Положения и выводы соответствуют представленному фактическому материалу.

Вышеперечисленное позволяет считать результаты Е.Ю. Кириченко и вытекающие из них выводы и рекомендации обоснованными и достоверными.

Достоверность и новизна научных положений, выводов и рекомендаций.

Кроме вышеперечисленного, достоверность научных положений, выводов и рекомендаций подтверждена широкой апробацией результатов исследования соискателя. Результаты научных исследований вошли в отчеты по грантам РФФИ, Минобразования, грантам ЮФУ, Госзадания Минобрнауки России, гранта Министерства науки и высшего образования РФ, а также представлены на конференциях и съездах различного уровня.

Диссертационная работа Е.Ю. характеризуется научной новизной. Соискателем впервые проведено иммуногистохимическое исследование зон коркового (баррельная кора) и подкоркового (релейные и вентральные ядра таламуса) представительства вибрисс с использованием антител к синаптофизину, миелину, нейрофиламентам, глиальному фибриллярному кислому белку, парвальбумину, соматостатину, которое позволило обнаружить схожую уникальную морфоструктурную организацию исследуемых зон. Получены оригинальные данные о распределении белков щелевых контактов в нейронах и в глиии корковых и подкорковых зон представительства вибрисс. Впервые получены данные о наличии элементарных ансамблей тормозных нейронов, объединенных глиальными и нейрональными щелевыми контактами, которые осуществляют таламокортикальную и кортикоталамическую передачу в мозге. Впервые продемонстрирована гетерогенность астроцитов по экспрессии белков щелевых контактов коннексина 30 и коннексина 43 в коре и таламусе, а также охарактеризовано их распределение в исследуемых зонах. Впервые продемонстрировано взаимное пространственное расположение химических синапсов и глиальных щелевых контактов, содержащих коннексин 43, и установлено их участие в регуляции нейрональной активности в составе трехчастного синапса.

Впервые даны подробные ультраструктурные характеристики щелевых контактов, образующих панглиальные сети. Получены новые оригинальные данные о структуре гемэнцефалического барьера, в состав которого входят щелевые контакты астроглии, содержащие коннексин 43 и коннексин 30.

В процессе исследования соискателем были разработаны: оригинальная методика изготовления серийных ультратонких срезов для изучения ультраструктуры нервных и глиальных клеток, а также клеточных компартментов в объеме; собственные протоколы исследования коннексинов и щелевых контактов методами иммуофлюоресцентной конфокальной микроскопии и электронной иммуногистохимии (pre- и post-embedding). Разработанные протоколы позволяют осуществлять визуализацию любых антигенов, специфичных для нервной ткани на светооптическом и ультраструктурном уровнях.

Значимость для науки и практики полученных соискателем результатов.

На основании полученных результатов сформулирована гипотеза, согласно которой щелевые контакты являются важным морфологическим субстратом для обеспечения локальной и дистантной синхронизации ритмической активности при таламокортикальном и синаптическом проведении, для регуляции нейрональной активности на уровне трехчастного синапса и для обеспечения тканевого и клеточного гомеостаза в корковых и подкорковых клеточных ансамблях. Данные об ультраструктурных характеристиках щелевых контактов, а также составляющих их различных типах коннексинов и коннексонов в составе нейро-глио-сосудистых комплексов дополняют и расширяют имеющиеся знания об их структуре, функциях и о механизмах регуляции работы ГЭБ. Полученные результаты и разработанные методы настоящего комплексного морфологического исследования могут быть использованы как студентами, аспирантами-физиологами и ветеринарными врачами, так и морфологами при исследовании структурной организации, цито-, вазо- и синаптоархитектоники головного мозга животных. Полученные результаты о распределении щелевых контактов и коннексинов имеют прикладное значение в рамках разработки новых терапевтических возможностей лечения для ряда дегенеративных заболеваний ЦНС животных, в том числе прионных болезней. Настоящее морфологическое исследование способствует разработке «дорожной карты» для исследования механизмов блокировки коннексинов или уменьшения

коммуникации посредством щелевых контактов в нанотрубочках при развитии ряда нейродегенеративных заболеваний. Данные о распределении коннексинов и щелевых контактов в норме могут способствовать пониманию механизмов малигнизации и инвазии клеток астроцитарных опухолей ЦНС, а также разработке различных терапевтических стратегий по управлению коннексинами и щелевыми контактами в опухолях для повышения эффективности противоопухолевой терапии. Полученные сведения о гетерогенности астроглии по экспрессии коннексинов вносят особый вклад в существующие представления о биологии глиальных опухолей ЦНС млекопитающих. Результаты диссертационного исследования вошли в «Методические положения для проведения лабораторных и научных работ по изучению нейроморфологического и ультраструктурного анализа нервной ткани», рассмотренные, одобренные и рекомендованные к изданию Комиссией «Фармакология и терапия» секции зоотехнии и ветеринарии Отделения сельскохозяйственных наук РАН (протокол № 3 от 11.12.2020), а также монографию «Холинергические и потенциал-зависимые механизмы локального ритмогенеза в нейронных колонках соматической коры крысы (2011 г.).

Оценка содержания и оформления диссертации. Диссертационная работа Е.Ю. Кириченко изложена на 210 страницах машинописного текста и включает Введение, Обзор литературы, Собственные исследования, содержащие 16 глав и подглав полученных автором результатов с их обсуждением, Заключение, Выводы, Список литературы, состоящий из 338 источников отечественных и зарубежных авторов. Работа иллюстрирована 47 рисунками и тремя таблицами.

Введение содержит все необходимые разделы. В *главе 1* приведен обстоятельный и глубокий обзор становления современных представлений о структуре щелевых контактов и составляющих их белков-коннексинов в центральной нервной системе, о молекулярной структуре коннексинов, о характеристике основных видов белков-коннексинов, представленных в ЦНС и их функциях, об организации коркового и таламического уровней организации тактильного анализатора крыс. В *главе 2* последовательно изложены основные результаты диссертационной работы, в ходе выполнения которой соискатель, используя широкий спектр современных методов исследования – гистологических, иммуногистохимических, иммунофлуоресцентной конфокальной

микроскопии, электронномикроскопических, иммуноэлектронномикроскопических и морфометрических, которые подробно описаны в главе «Материалы и методы» – установила морфологические закономерности и особенности строения щелевых контактов клеток и составляющих их белков коннексинов в зонах формирования корковых и подкорковых нейронных ансамблей вибриссовой системы крыс. Начав с изучения особенностей пространственного распределения в бочонках S1 коры нейрональных белков – синаптофизина и нейрофиламентов, антигенов глиальных клеток – глиального фибриллярного кислого белка, миелина и парвальбумина, и обсуждая их роль в структурной организации баррельной коры, автор перешла к изучению морфологических характеристик и распределения белков нейронов и глии на уровне таламического представительства вибрисс в головном мозге крыс. Разработав методику идентификации баррелоидов на вибротомных фронтальных срезах таламуса и установив локализацию нейроглиальных антигенов в вентральных и ретикулярном ядрах таламуса, автор высказала предположение о сходном строении баррелоидов таламуса с баррелями коры. Полученные в этом разделе данные об иммуноморфологической архитектонике исследуемых областей коры и таламуса необходимы для понимания морфофункциональной роли щелевых контактов, расположенных в них. Поэтому последующие главы диссертационной работы Е.Ю. Кириченко были посвящены изучению распределения коннексинов в соматической коре, в вентральных и ретикулярном ядрах таламуса крыс на светооптическом и электронном уровнях, а именно автором изучены особенности ультраструктуры нейро-нейрональных, глия-глиальных щелевых контактов и щелевых контактов нейро-глио-сосудистых комплексов в исследуемых областях головного мозга, результаты которых подтверждают теорию взаимной скооперированной деятельности между щелевыми контактами и химическими синапсами в осуществлении функции синхронизации ритмической активности нейронов одного ансамбля. В заключении автором обобщены результаты проведенных исследований и делается вывод об их фундаментальной и прикладной значимости. Выводы обоснованы экспериментальными исследованиями, логично сформулированы. Принципиальных замечаний по оформлению диссертационной работы нет. Представленный автором иллюстративный материал высокого качества, что позволяет детально рассмотреть структурную организацию изучаемых объектов.

Личный вклад соискателя в разработку научной проблемы. Соискателем лично и в соавторстве выполнены: планирование исследований, постановка цели и задач, разработка протоколов для иммуногистохимического, иммунофлюоресцентного и электронноиммуногистохимического исследований, процедуры фиксации головного мозга методом транскардиальной перфузии и иммуно-гистохимические исследования, иммунофлюоресцентные исследования в конфокальном двухфотонном микроскопе, электронномикроскопические исследования; осуществлен выбор методологии исследования, проведен поиск, анализ и обобщение научной информации, литературных данных, выполнены эксперименты, проведен анализ и интерпретация результатов исследования, подготовлены научные публикации, написаны и оформлены рукописи. Доля участия соискателя при выполнении диссертации составила 95%.

Подтверждение опубликования основных результатов диссертации в научной печати. По материалам диссертации опубликовано 54 печатные работы в отечественных и зарубежных изданиях, из которых 25 статей – в изданиях, включенных ВАК России в перечень изданий, рекомендуемых для опубликования основных научных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата и доктора наук, из которых 21 – публикации в изданиях, включенных в базы данных Scopus, Web of Science.

Соответствие содержания автореферата основным положениям диссертации. Автореферат диссертационной работы отражает ее основное содержание, включает все основные разделы, текст четко структурирован, результаты проведенных исследований доказательно проиллюстрированы.

Конкретные рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации. Установленные автором особенности ультраструктуры щелевых контактов нейронов и их роль в синхронизации ритмической активности и ее поддержании могут быть использованы для разработки методов и средств диагностики и фармакотерапии функциональных, нейродегенеративных и опухолевых заболеваний у млекопитающих. С целью осуществления контролируемой доставки лекарственных веществ в клетки ЦНС рекомендовано учитывать функциональное состояние щелевых контактов, входящих в состав ГЭБ.

Замечания и вопросы по диссертации. Принципиальных замечаний по диссертационной работе Е.Ю. Кириченко нет. Для целостного представления объема выполненных автором исследований и полученных ею результатов следовало бы представить дизайн или схему научного исследования. В диссертационной работе неоднократно указывается о подсчете изучаемых структур клеток (стр.66, 69), однако, цифровых данных, подтверждающих полученные результаты не представлено. Отсутствие подзаголовка в *главе 2.2.2* затрудняло оценку объема результатов, полученного лично автором. В выводах отсутствует цифровой материал, подтверждающий выдвинутые автором предположения (вывод 4, 5). При прочтении диссертационной работы, возникли следующие вопросы:

1. Какой методикой Вы руководствовались при выборе средства для анестезии у крыс?
2. Крысы какого возраста были включены в эксперимент? Влияет ли возраст крысы и выбранное Вами средство для общей анестезии на ультраструктуру щелевых контактов нейронов? В течение какого времени производили взятие материала для гистологического и остальных видов исследований?
3. По каким признакам судили о «повышенной» экспрессии синаптофизина между группировками клеток (подрисуночная подпись №8, стр.61), если в диссертации нет сравнения по возрастам или функциональному состоянию животных?
4. Имеет ли значение учет количества щелевых контактов на единицу площади исследуемой структуры головного мозга для оценки их функционального состояния?

Заключение. Диссертационная работа Кириченко Евгении Юрьевны на тему «Роль щелевых контактов и белков-коннексинов в нейро-глиальных и нейро-глио-васкулярных взаимодействиях в таламокортикальной системе мозга крыс» является завершённой научно-квалификационной работой, выполненной на высоком научно-методическом уровне, которая содержит решение научной проблемы установления связи нейронных и глиальных сетей, передающих сигналы, посредством которых мозг может обрабатывать и передавать информацию для выполнения соответствующих действий, имеющая важное значение для развития биологической

науки нейроанатомии. По актуальности, новизне, теоретической и практической значимости, глубине исследования и степени доказательности диссертация соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения учёных степеней», утверждённого постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года № 842 (с изменениями в редакции постановлений Правительства Российской Федерации № 355 от 21.04.2016 года, № 748 от 02.08.2016 года), предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени доктора наук и может быть представлена к публичной защите в диссертационный совет Д 220.002.02, а Кириченко Евгения Юрьевна заслуживает присуждения ей искомой степени доктора биологических наук по специальности 06.02.01 – диагностика болезней и терапия животных, патология, онкология и морфология животных.

Отзыв ведущей организации составлен на основании заключения расширенного заседания кафедры диагностики, внутренних незаразных болезней, фармакологии, хирургии и акушерства и кафедры анатомии, гистологии, физиологии и патологической анатомии ФГБОУ ВО «Омский ГАУ» протокол № 3 от 30 марта 2021 года.

Заведующая кафедрой диагностики, внутренних незаразных болезней, фармакологии, хирургии и акушерства ФГБОУ ВО Омский ГАУ, доктор ветеринарных наук (06.02.01 – диагностика болезней и терапия животных, патология, онкология и морфология животных), доцент

Бойко Татьяна Владимировна

Бойко Татьяна Владимировна, доктор ветеринарных наук, доцент
644008, Сибирский федеральный округ, Омская область, г. Омск, Институтская площадь, 1;
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Омский государственный аграрный университет имени П.А.Столыпина,
Тел. 8(3812) 23-03-92, 8-913-670-45-77, tv.boyko@omgau.org

Подпись Бойко Т.В. заверяю:



ПОДПИСЬ <i>Бойко Т.В.</i>	
ЗАВЕРЯЮ: <i>Магалева Ольга</i>	
ПОДПИСЬ <i>Кириченко Е.Ю.</i>	РАСПИСКА <i>Т.В. Бойко</i>
<i>05 04</i>	20 <i>21</i> г.
дата	