

В І Д Г У К

офіційного опонента на дисертаційну роботу *Лушнікової Ірини Василівни*

«Міжклітинні взаємодії та ендogenousні механізми нейропротекції у

гіпокампі при моделюванні ішемічного пошкодження»,

представлену до захисту на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.13 – фізіологія людини і тварин

Актуальність обраної теми. Дисертаційна робота Лушнікової І.В. присвячена вирішенню питань, які є основою новітнього напрямку медико-біологічної науки, що ставить за мету розкриття первинних молекулярних механізмів розвитку різних патологій, включаючи і хвороби мозку та пошук на цій основі нетрадиційних шляхів і підходів до запобігання незворотного ушкодження клітин та тканин. Ендogenousні механізми, відповідальні за підтримку клітинного гомеостазу або їх порушення, обумовлені багатьма сигнальними системами на субклітинному та міжклітинному рівні. Розуміння цих процесів надає можливість розробки засобів для корекції процесів, задіяних при ушкодженні клітин і тканин шляхом модуляції механізмів, що забезпечують життєздатність клітин у період так званого «терапевтичного вікна», коли негативні зміни можуть бути оборотними, зокрема при ішемії мозку. Рівень кисню та глюкози є найбільш критичним чинником для нормального функціонування та життєздатності мозкової тканини. В організмі кисень та глюкоза потребують постійного надходження з током крові, оскільки активно використовуються клітинами та недостатньо депонуються у нервовій тканині. При інсульті виникає порушення мозкового кровообігу, після чого через деякий час нервові клітини гинуть, але існує певний період, коли включаються адаптивні та компенсаторні механізми, які забезпечують підтримку гомеостазу клітин і тканин та їх життєздатність. Дослідження таких ендogenousних механізмів, що значною

мірою обумовлені міжклітинними взаємодіями, важливо з точки зору розуміння молекулярних механізмів розвитку ішемічного ушкодження мозку, а також можливості корекції перебігу цієї патології.

Виходячи з всього викладеного вище, вважаю, що рецензована робота є актуальною, як з точки зору вирішуваних в ній фундаментальних питань, так і практичного застосування її результатів.

Зв'язок роботи з державними науковими програмами. Робота виконувалася у відділі цитології Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України в період з 2009 по 2018 рік в рамках наукових програм: «Вивчення генетично-детермінованих молекулярних механізмів міжклітинної та внутрішньоклітинної сигналізації в нормі та при патологіях» №0112U001475; «Механізми внутрішньоклітинної та міжклітинної сигналізації; вивчення шляхів їх модуляції та пошук нових фармакологічних впливів» №0107U010843; «Дослідження молекулярно-генетичних механізмів фізіологічних та патофізіологічних процесів та розробка методів їх корекції» №0107U005336; «Клітинні та молекулярні механізми нейродегенерації та шляхи її корекції» №0113U007273; «Молекулярні та генетичні механізми клітинної сигналізації в нормі та патології» №UF45.2/001 (на базі державної ключової лабораторії молекулярної та клітинної біології).

Повнота викладення наукових положень, висновків та рекомендацій в опублікованих працях. Основні положення дисертації опубліковані у 52 наукових працях, з них 22 статті у фахових виданнях (11 – у наукових періодичних виданнях України і 11 – у провідних зарубіжних журналах з високим рейтингом та високим імпаکت фактором), та 30 тез доповідей у матеріалах міжнародних та вітчизняних наукових з'їздів і конференцій. Обсяг друкованих робіт та їх кількість повністю

відповідають вимогам ДАК МОН України щодо публікації основного змісту дисертації на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук. Зміст автореферату повністю відповідає основним положенням дисертації.

Наукова новизна досліджень та одержаних результатів. Автором встановлено принципово нові факти, важливі для розвитку сучасних уявлень про ендogenousні механізми міжклітинної взаємодії та ендogenousної нейропротекції за умов ішемічного ураження мозку. Вкрай важливим є те, що рецензована робота заснована на комплексному підході у з'ясуванні як клітинних, так і молекулярних механізмів ішемічного пошкодження, коли у модельних експериментах *in vitro* використано культуру клітин гіпокампа - структури мозку, яка є найбільш чутливою до впливу ішемії. Автором вперше встановлено відповіді різних типів нервових та гліальних клітин за однакових умов аноксії-реоксигенації, а також важливі закономірності феномену відставленої загибелі нервових клітин та механізмів ендogenousної нейропротекції. В роботі детально охарактеризовані особливості реакції нервових клітин гіпокампа, зміни їх життєздатності та метаболічної активності. Вперше виявлено початкові структурні перебудови синаптичного апарата пірамідних нейронів і інтернейронів, зокрема збудливих і гальмівних синапсів, а також гліальних клітин за умов киснево-глюкозної деривації. Експериментальні дані дозволили з'ясувати механізми модуляції функціонування і життєздатності пірамідних нейронів за участю інтернейронів, базуючись на аналізі їх взаємодії. Такий підхід є перспективним з точки зору пошуку засобів, які могли б підвищити поріг толерантності нервових клітин у несприятливих умовах.

Практичне значення представленої роботи. Результати

досліджень автора свідчать не тільки про теоретичну новизну роботи, а і про органічне поєднання цих фундаментальних розробок з перспективою їх подальшого використання в практиці. Вони можуть служити об'єктивним підґрунтям для розробки нових методичних підходів до боротьби з наслідками різних форм гіпоксичного ураження мозку. Отримані в роботі дані можуть стати основою розробки нових клінічних засобів та технологій в боротьбі тими формами гіпоксичних уражень, які не піддаються лікуванню традиційними засобами або зовсім не мають технологій такого лікування.

Зважаючи на те, що результати дослідження значно поглиблюють розуміння початкових і відтермінованих ефектів киснево-глюкозної деривації на клітини гіпокампа різних типів, а також розкривають ключові молекулярні механізми, пов'язані з міжклітинними взаємодіями, що обумовлюють функціонування нервових клітин і їх виживання, то все це може бути підґрунтям для інноваційних підходів у комплексній терапії ішемічно ушкодженого мозку.

Використана у дисертаційній роботі експериментальна модельна система *in vitro* може бути запропонована для подальших досліджень мозкових патологій різного генезу та для тестування нових нейропротекторних засобів.

Отримані в даній роботі відомості про системні механізми функціонування мозку за умов гіпоксичного враження заслуговують на використання при читанні загальних та спеціальних курсів для студентів кафедр нормальної і патологічної фізіології медичних університетів та кафедр фізіології людини і тварин класичних університетів.

Відповідність дисертації вимогам ДАК МОН України.
Дисертаційна робота Лушнікової І.В. побудована згідно вимог ДАК МОН України і включає в себе всі відповідні розділи.

Дисертація складається із анотації, вступу, огляду літератури, матеріалів та методів дослідження, розділу власних досліджень і їх обговорення, висновків списку використаних джерел, який нараховує 347 джерел. Загальний обсяг роботи викладено на 310 сторінках, основна частина дисертації викладена на 267 сторінках, містить 4 таблиці і 105 рисунків.

У вступі Лушніковою І.В. обґрунтована актуальність теми дисертації, сформульовано мету, завдання, об'єкт і предмет дослідження, наведено методи дослідження, викладені наукова новизна та практичне значення отриманих результатів, наведені дані про особистий внесок, публікації та апробацію результатів дисертації.

Літературний огляд викладено на 33 сторінках машинописного тексту, що не перевищує 20 % обсягу основної частини тексту дисертаційної роботи. Написано літературний огляд з урахуванням сучасних наукових даних. Написаний логічно і послідовно, він свідчить про здатність автора до критичного осмислення і теоретичного узагальнення різномірних даних. У цьому розділі наведено детальний аналіз сучасних даних щодо структурно-функціональної організації гіпокампа, детально проаналізовано наявні на тепер дані щодо клітинних та молекулярних реакцій на дію гіпоксії. Зокрема розкрито механізми різних шляхів ранньої та пізньої загибелі клітин мозку за умов критичної тривалості гіпоксії. В даному розділі особливу увагу приділено участі в цих процесах клітинам глії.

Закінчується літературний огляд коротким узагальненням, де вказується на нез'ясовані питання та актуальність їхнього вирішення.

У розділі "**Матеріали та методи досліджень**" наведено опис схеми експериментів із загальною характеристикою об'єкту дослідження, детальним описом методів отримання та культивування зрізів і клітин гіпокампа, отримання мультипотентних мезенхімальних

стромальних клітин. Детально описано процедуру киснево-глюкозної деривації. Експериментальні дослідження проведено з використанням біохімічних, морфологічних, електрофізіологічних, ПЛР; імуноцито- та гістохімічних методів на базі світлової, конфокальної та електронної мікроскопії; 3D-реконструювання мікрооб'єктів. Вірогідність отриманих результатів та висновків роботи підтверджуються коректною статистичною обробкою. Доцільність в застосуванні запропонованих методик та підходів не викликає ніякого сумніву.

У розділі «Результати досліджень» та їх обговорення, що містить десять підрозділів висвітлено експериментальні дані та дана глибока і всебічна оцінка отриманих результатів.

Автором встановлена пряма залежність ступеня ушкодження CA1 пірамідних нейронів від тривалості киснево-глюкозної деривації та тривалості подальшої реоксигенації. При цьому із зростанням часу деривації суттєво зменшувалась загальна кількість пірамідних нейронів та кількість неушкоджених пірамідних клітин. При цьому інтернейрони зберігали життєздатність, а їхня кількість суттєво не зменшувалася. Астрогліальні та мікрогліальні клітини також залишалися життєздатними. Показано, що ушкодження нейронів за умов киснево-глюкозної деривації значною мірою пов'язане зі зниженням функціональної активності мітохондрій та глутаматною ексайтотоксичністю. Надзвичайно важливими є дані автора про зміни синаптичних контактів за умов експериментальних впливів. Зокрема в роботі показано, що протягом першої години після депривації поступово збільшуються морфометричні показники всіх елементів синаптичного апарату. Крім того, спостерігається розширення об'єму гліальних відростків навколо збудливих синапсів. Встановлено також, що інтернейрони мають здатність модулювати життєздатність пірамідних нейронів CA1 зони гіпокампальних зрізів при киснево-глюкозній депривації. Розкривши роль

гліцинових рецепторів в реакціях гіпокампульних клітин на дію гіпоксії, автор висуває надзвичайно цікаве припущення про те, що для розробки ефективних терапевтичних стратегій захисту пірамідних нейронів одним із таких шляхів може бути модуляція сигнальних шляхів, опосередкованих гліциновими рецепторами. В роботі показано, що нейронні молекули клітинної адгезії сприяють передачі сигналів та стійкості нейронів до патологічних впливів. Експериментальні дані автора вказують на те, що мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини мають нейропротекторний вплив як при контактному, так і безконтактному співкультивуванні з органотиповими культурами мозку в умовах киснево-глюкозної депривації

В останньому підрозділі автор узагальнює отримані результати, та обґрунтовує висновки роботи. Цей розділ засвідчує надзвичайно високий фаховий рівень автор та переконує в пріоритетності вагомих наукових здобутках даної роботи. Крім того, узагальнення результатів дослідження дозволило авторові зробити аргументовані висновки. У дев'яти висновках дисертації цілком і повністю відображені основні результати роботи.

Дисертаційна робота Лушнікової І.В. залишає виключно позитивне враження. Це є комплексне фундаментальне дослідження, яке розкриває нові аспекти щодо механізмів розвитку ішемічного ушкодження гіпокампа та пропонує перспективні шляхи нейропротекції.

Недоліки дисертації та автореферату щодо їх змісту та оформлення. При розгляді роботи виникла необхідність зробити ряд зауважень і побажань.

1. Для кращого сприйняття різнобічного матеріалу щодо послідовності та домінування тих чи інших механізмів при розвитку ішемічного пошкодження пірамідних нейронів гіпокампа, залученню

клітин глії, синаптичних змін доцільним було представити все це у вигляді загальної схеми.

2. В рамках загальної дискусії хотілося б почути думку автора, про те, чи здатні інтернейрони, які менше страждають за умов гіпоксії, виконувати функцію нормалізації роботи гіпокампа при втраті пірамідними нейронами сигнальних функцій або при їх загибелі в умовах критичного дефіциту кисню і глюкози.

3. Згідно отриманих даних за умов киснево-глюкозної деривації всі типи гліальних клітин зазнають меншого ушкодження, ніж нейрони, тоді виникає запитання, чи змінюється якимось чином взаємодія, скажімо, астрогліальних клітин з неушкодженими нейронами, виходячи з отриманих вами результатів?

4. Що стосується ролі гліцинових рецепторів, як можливих «захисників» нейронів гіпокампа при ішемічному ураженні, то чи наявні натеper дані про розподіл таких інтернейронів в самому гіпокампі і чи можливо те, в що зоні CA1 кількість інтернейронів, які формують гліцинові синапси на нейронах є найменшою, тому нейрони CA1 і є найбільш уразливими до всяких пошкоджуючих факторів, зокрема і ішемії?

5. В роботі показано, що мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини мають нейропротекторний вплив і при безконтактному співкультивуванні з органотиповими культурами мозку, тому виникає цілком природне прикладне запитання, за яких умов при ураженні мозку треба було б вводити в уражений мозок клітини, а в яких певні молекулярні сполуки, які вони виділяють?

Зроблені зауваження та поставлені запитання ніяким чином не знижують теоретичної та практичної цінності дисертації.

Висновок. Дисертаційна робота Лушнікової І.В. «Міжклітинні

взаємодії та ендогенні механізми нейропротекції у гіпокампі при моделюванні ішемічного пошкодження», яка присвячена вивченню надважливої сучасної наукової проблеми, за своєю актуальністю, обсягом проведених досліджень, їх фундаментальним і прикладним значенням повністю відповідає п.10 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 року №567 зі змінами, внесеними згідно постанови Кабінету Міністрів України №656 від 10.08.2015 року та №1159 від 30.12.2015 року, щодо дисертацій на здобуття наукового ступеня доктора наук, а її автор цілком заслуговує на присудження їй наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.13 «Фізіологія людини і тварин».

Офіційний опонент:

Завідувач кафедри

фізіології людини і тварин

ННЦ «Інститут біології та медицини»

Київського національного університету

імені Тараса Шевченка,

докт. біол. наук, професор



Макарчук М.Ю.

ПІДПИС ЗАСНІДАЧОГО
ВЧЕНОГО СЕКРЕТАРЯ НАЧ
КАРАУЛЬНА Н.В.
05.09.2019р.

