

В диссертационный совет  
Д 208.072.05 при ФГАОУ ВО  
РНИМУ им. Н.И. Пирогова  
Минздрава России

## ОТЗЫВ

на автореферат диссертации Ивановой Анны Евгеньевны «Особенности влияния провоспалительных факторов на функциональное состояние астроцитов», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.01–Физиология

Ишемия мозга представляет собой сложный комплекс повреждающих факторов, к которым относятся депривация кислорода и глюкозы, а также возможность повторных поражений в период реперфузии ткани. Эти события непосредственно связаны с системой гемостаза и в первую очередь с её ключевой протеазой – тромбином, а также с появлением во внеклеточном пространстве разнообразных провоспалительных молекул, воздействующих на окружающие клетки и вызывающих пост-ишемическое воспаление. Астроциты являются одним из основных компонентов центральной нервной системы. Астроглия участвует в образовании гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), метаболических процессах в нервных клетках, поддержании электролитного баланса в межклеточном пространстве и реагирует на различные повреждения головного мозга. Развивающийся при этом реактивный астроглиоз характеризуется высокой скоростью пролиферации астроцитов, а также серьезными морфологическими и функциональными изменениями в самих астроцитах, например, повышение белка S100b. Реактивный астроглиоз встречается при различных вирусных заболеваниях, энцефалопатиях, травмах головного мозга, при нейродегенеративных заболеваниях (например, болезнь Альцгеймера). Многочисленные исследования показывают связь между хронической активацией глиальных

клеток (астроциты и микроглия) и последующим нейровоспалением, а также аутоиммунными реакциями и нейродегенерацией. При этом активация астроцитов усугубляет течение основного заболевания и способствует прогрессированию хронических нейродегенеративных заболеваний. Тем не менее, до сих пор нет информации о потенциальном влиянии провоспалительных факторов, ассоциированных с ишемией головного мозга, на функционально-морфологические параметры астроцитов. В этой связи работа Ивановой Анны Евгеньевны «Особенности влияния провоспалительных факторов на функциональное состояние астроцитов» является актуальной и заслуживает внимания.

Целью работы было изучение особенности влияния провоспалительных факторов на культивируемые астроциты крысы, подвергнутые кислородно-глюкозной депривации. Автором были выдвинуты сложные научные задачи, грамотно сформулированные и направленные на решения комплекса теоретических и практических проблем. Таких как особенности развития повреждений мозговой ткани в условиях «ишемии» и «реперфузии» и динамика изменения провоспалительных факторов, тромбина, бензоил-АТФ и липополисахаридов на культивируемые астроциты крысы при кислородно-глюкозной депривации. В ходе работы с помощью методов иммуноферментного анализа, полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени, иммуноблотинга и иммуноцитохимии было впервые комплексно охарактеризовано влияние ишемии на функциональное состояние астроцитов в клеточной культуре. Другим важным аспектом работы стало изучение внутриклеточных эффектов провоспалительных молекул тромбина, бензоил-АТФ и липополисахаридов, которые могут появляться в области ишемического повреждения.

В работе впервые показано, что снижение кислорода и глюкозы вызывает гибель астроцитов крысы и их последующую пролиферацию, изменяет морфологию астроцитов через перестройку актинового цитоскелета. При этом действие протеазы тромбина носит дозозависимый

характер и определяется типом повреждения. Установлено, что тромбин в концентрации 10 нМ снижает гибель астроцитов в условиях кислородно-глюкозной депривации. Впервые продемонстрировано, что тромбин в высоких концентрациях стимулирует формирование пустых полей в монослое первичной культуры астроцитов, а тромбин и липополисахарид обладают провоспалительным действием на культивируемые астроциты крысы, индуцируя их пролиферацию, синтез и секрецию оксида азота (NO), секрецию интерлейкина-6 (IL-6) и активацию сигнального пути NF-κB. Это свидетельствует о возможности вовлечения сериновой протеазы в развитие воспаления и апоптотической гибели астроцитов при ишемии мозга. Работа содержит абсолютно новые данные о том, что бензоил-АТФ вызывает гибель астроцитов крысы через активацию P2X7. Кроме того, бензоил-АТФ NO-синтаз-зависимым образом стимулирует секрецию NO астроцитами, а также инициирует секрецию цитокинов IL-6 и TNF-α опосредовано через активацию пуринергических рецепторов 2-ого типа, отличных от P2X7, что в совокупности всех полученных данных обуславливает научную значимость и новизну работы.

Полученные данные раскрывают потенциал применения таких провоспалительных молекул, как тромбин, бензоил-АТФ и липополисахариды, которые могут появляться в области ишемического повреждения, в качестве регуляторов астроглиоза при патологических состояниях головного мозга. Таким образом, работа Ивановой Анны Евгеньевны представляет большой интерес, как со стороны научной теории молекулярных механизмов функционирования астроцитов в условиях воздействия разных провоспалительных факторов, ассоциированных с ишемией, так и имеет непосредственно прикладное применение в области создания эффективных цитопротекторов и модуляторов состояния астроцитов при ишемическом повреждении мозга.

Эксперименты проводились на модели ишемии *in vitro* в условиях депривации кислорода и глюкозы на культуре грызунов, астроциты выделяли из мозга новорожденных крысят линии Wistar, мышат линии C57BL/6. Депривация кислорода и глюкозы широко используется в качестве модели ишемии *in vitro* в отечественных и международных научных исследованиях в области нейробиологии, в частности при исследовании нейроглии в норме и при патологии. В ходе работы были использованы ряд современных методов биохимии, молекулярной и клеточной биологии.

Выводы и положения, выносимые на защиту, основаны на статистически значимых данных. Все эксперименты были выполнены минимум в 3-х независимых повторях.

Полученные результаты были апробированы на российских и международных конференциях, посвященных тематики данной работы. По теме диссертации опубликовано 14 работ, среди которых 5 статей в научных журналах (входят в перечень рецензируемых научных изданий ВАК РФ, индексируются в WoS и/или Scopus) и 9 тезисов в сборниках материалов научных конференций. Результаты диссертационной работы используются при чтении спецкурса, при проведении большого практикума и в исследовательской деятельности научной группы по изучению механизмов регуляции процессов нейропротекции, нейрорепарации и воспаления регуляторными пептидами и протеазами. Научные положения диссертации соответствуют паспорту научной специальности 03.03.01 – Физиология. Вся экспериментальная часть работы в полном объеме выполнена автором лично. Автор принимал личное участие в постановке задач и протоколов проведения экспериментов, анализе полученных результатов и подготовке на их основе публикаций. Все разделы диссертационной работы написаны лично автором.

Считаю, что диссертационная работа Ивановой Анны Евгеньевны «Особенности влияния провоспалительных факторов на функциональное состояние астроцитов», выполнена на высоком научно-методическом уровне и содержит новые решения актуальных для современной медицины проблем. В настоящей работе, вызванное тромбином и липополисахаридом повышение апоптотического индекса, а именно соотношения про- и антиапоптотических белков Bax/Bcl2, в астроцитах указывает на участие этих провоспалительных факторов в регуляции апоптоза в культивируемых астроцитах. Однако, было бы более информативно использовать два альтернативных теста для оценки уровня апоптоза. Для раскрытия молекулярных механизмов воздействия тромбина на функциональное состояние астроцитов полезным было бы определить уровень активности тромбина в культивируемых астроцитах в контроле и в условиях кислородно-глюкозной депривации. Стоит отметить, что используемая в настоящей работе модель ишемии *in vitro* в условиях депривации кислорода и глюкозы на культуре грызунов подходит для скрининга потенциальных ингибиторов тромбина, а также для изучения молекулярного действия тромбина и его ингибиторов при ишемии. Также интересно было бы оценить воздействие сразу двух провоспалительных факторов на исследуемые параметры астроцитов. Однако, данные замечания носят лишь рекомендательный характер.

Диссертационная работа Ивановой Анны Евгеньевны «Особенности влияния провоспалительных факторов на функциональное состояние астроцитов» является законченной, самостоятельной научно-квалификационной работой, содержащей оригинальное решение актуальной научной задачи по исследованию влияния провоспалительных факторов на культивируемые астроциты крысы в условиях недостатка кислорода и глюкозы.

Представленная диссертационная работа полностью соответствует требованиям п.9 «Положение о присуждении ученых степеней»,

утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24.09.2013 г. (с изменениями в редакции постановлений правительства Российской Федерации №335 от 21.04.2016 г., №748 от 2.08.2016г., №650 от 29.05.2017г., №1024 от 28.08.2017г., №1168 от 01.10.2018г.), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор – Иванова Анна Евгеньевна – заслуживает присуждение ученой степени кандидата наук по специальности 03.03.01– Физиология.

Демьяненко Светлана Викторовна  
д.б.н., ведущий научный сотрудник,  
зав. лабораторией «Молекулярная нейробиология»  
Академии биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского  
Южного федерального университета



344090, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки 194/1, оф. 513

Тел.: +79185092185

e-mail: [svdemvanenko@sfedu.ru](mailto:svdemvanenko@sfedu.ru)

4 мая 2022 г.

*Подпись С.В. Демьяненко, д.б.н., ведущего научного  
сотрудника, зав. лабораторией «Молекулярная  
нейробиология» Академии биологии и биотехнологии  
им. Д.И. Ивановского, завершено*

*Директор  
Академии биологии и  
биотехнологии  
им. Д.И. Ивановского*

