

ОТЗЫВ
официального оппонента
на диссертационную работу Шаденко Виктории Николаевны
«Лабильность пептидергических нейронов центральных нервных ганглиев *Lymnaea stagnalis* при экспериментальной гипергликемии»,
представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности
03.03.01 – физиология

1. Соответствие диссертации специальности и отрасли науки, по которым она представлена к защите

Диссертационное исследование Шаденко В.Н. посвящено изучению особенностей функционирования нейронов центральных нервных ганглиев прудовика обыкновенного (*Lymnaea stagnalis*) в условиях экспериментальной гипергликемии. В частности, автор доказывает гипотезу о сигнальной роли глюкозы в отношении нейронов, подчёркивая ключевую роль пептидергических нейронов в рецепции глюкозы. По объекту, предмету, методам исследования и полученным результатам работа соответствует паспорту специальности 03.03.01 – «Физиология». Как указано в паспорте данной специальности, физиология – область науки, исследования в которой включают:

изучение механизмов функционирования здорового организма, его структурных элементов (функциональных систем, органов, тканей, клеток) и их регуляции в различных условиях жизнедеятельности;

установление общих закономерностей развития физиологических процессов в организме человека и животных в процессе фило- и онтогенетического приспособления к изменяющимся условиям внешней и внутренней среды.

В данном случае имеет место изучение механизмов функционирования нейронов, протекающих в них физиологических процессов в условиях гипергликемии, что соответствует вышеуказанному определению специальности «Физиология».

По положениям и выводам диссертация Шаденко В.Н. соответствует следующим параграфам паспорта специальности 03.03.01 – «Физиология»:

8 – Физиология нервной системы;

19 – Интегративная деятельность: сенсорные системы, высшая нервная деятельность, адаптация;

21 – Влияние факторов внешней среды на живые организмы;

23 – Моделирование функциональных состояний.

Объект и предмет исследования, а также базовое образование соискателя позволяют отнести диссертацию Шаденко В.Н. к отрасли «Биологические науки».

Таким образом, по тематике исследования, поставленным задачам, методологии их решения, полученным результатам и сделанным на их

основе выводов рецензируемая диссертация соответствует специальности 03.03.01 – «Физиология», отрасли «Биологические науки».

2. Актуальность темы диссертации

Глюкоза является одним из важнейших источников энергии для клеток, в том числе для нейронов. Известно, что глюкоза активно потребляется нервными клетками в период их интенсивной работы. Гипергликемия является одним из важнейших компонентов физиологической стрессорной реакции. Знание ответов нейронов на кратковременную и длительную гипергликемию очень важно для понимания приспособительных реакций центральной нервной системы в условиях острого и хронического стресса, а также других физиологических и патологических состояний, сопровождающихся повышением уровня глюкозы в крови.

Особую роль в функционировании центральной нервной системы играют пептидергические нейроны. Известен целый ряд нейропептидов, являющихся универсальными нейротрансмиттерами, участвующими в синаптической передаче практически у всех известных позвоночных и беспозвоночных организмов. В частности, определённые нейроны у беспозвоночных способны вырабатывать инсулиноподобные пептиды в ответ на повышение уровня глюкозы в гемолимфе. Однако влияние гипергликемии на нейроны, вырабатывающие другие нейропептиды, равно как и на нейроны другой медиаторной специфичности (дофаминергические, серотонинергические) остаётся неизученным. В связи с этим тему диссертации В.Н. Шаденко следует признать достаточно актуальной.

3. Степень новизны результатов, полученных в диссертации, и научных положений, выносимых на защиту

Диссертантом создана модель экспериментальной гипергликемии у моллюска *Lymnaea stagnalis*, при этом концентрация глюкозы измерена не только в гемолимфе, но и в органах. Продемонстрировано изменение оборонительного поведения животного в этих условиях, тем самым доказано влияние гипергликемии на функциональную активность нейронов.

Впервые показана особая, в отличие от нейронов другой медиаторной специфичности (дофаминергических и серотонинергических), роль пептидергических нейронов, не относящихся к пищевой сети, в рецепции глюкозы.

Впервые в экспериментах на изолированных нервных ганглиях *Lymnaea stagnalis* выявлены изменения спайковой активности и длительности фаз потенциала действия при кратковременном и длительном повышении уровня глюкозы в инкубационном растворе.

Впервые изучено влияние экспериментальной гипергликемии на изменения прооксидантно-антиоксидантного баланса в клетках нервных ганглиев *Lymnaea stagnalis*. При этом продемонстрировано отсутствие увеличения концентрации активных форм кислорода под влиянием

повышенных концентраций глюкозы и, в то же время, повышение активности антиоксидантных ферментов через сутки после гипергликемии (вероятнее всего, вследствие повышения экспрессии соответствующих генов).

4. Обоснованность и достоверность выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Эксперименты проведены на центральных нервных ганглиях прудовика большого (*Lymnaea stagnalis*), который является модельным объектом для изучения электрофизиологии нейронов и нейронных сетей. Диссертантом использованы ряд общепринятых современных методов исследования, среди которых электрофизиологические методы (регистрация электрической активности нейронов с помощью микроэлектродов), биохимические методы (измерение содержания глюкозы, активности компонентов антиоксидантной защиты), методы клеточной биологии (измерение содержания активных форм кислорода в клетках с помощью флуоресцентных зондов). Достоверность полученных результатов подтверждается достаточным количеством животных в опытных и контрольных группах. Диссертантом использованы современные статистические методы, адекватные поставленным задачам. В частности, при попарном сравнении групп данных применялись параметрические либо непараметрические методы сравнения в зависимости от нормальности распределения, использовались также соответствующие критерии (Крускала – Уоллиса, Фридмана) при сравнении нескольких групп данных.

Наряду с представлением данных собственных исследований, проведён подробный их анализ. В частности, глава 6 «Пептидергическая система нервных ганглиев *Lymnaea* при экспериментальной гипергликемии» посвящена обсуждению и подробному анализу полученных результатов. Выводы и положения, вынесенные на защиту, а также практические рекомендации достоверны и обоснованы, они логично вытекают из результатов исследования и их обсуждения.

5. Научная, практическая, экономическая и социальная значимость результатов диссертации с указанием рекомендаций по их использованию

Научная значимость результатов диссертации состоит в том, что продемонстрирована способность нейронов центральных нервных ганглиев *Lymnaea stagnalis*, в частности, пептидергических нейронов, реагировать на повышение концентрации глюкозы. Важно, что реакция специфична для отдельных типов нейронов, отличаясь в том числе у разных типов пептидергических нейронов, не входящих в пищевую цепь (VD1, RPaD2 нейроны). Наибольшую чувствительность к глюкозе показали пейсмейкерные нейроны VD1. Изменения при кратковременном воздействии глюкозы выражались в увеличении частоты генерации импульсов, при этом ускорялась медленная деполяризация мембраны. При более длительном

воздействии повышенных концентраций глюкозы отмечены увеличение продолжительности деполяризации и реполяризации. Таким образом, изменения в функционировании пептидергических нейронов, вероятно, связаны с изменением мембранной проводимости для ионов Na^+ и K^+ .

Важными для понимания реакций нейронов ЦНС на гипергликемию являются данные об увеличении активности системы антиокислительной защиты на следующие сутки после гипергликемии. Вероятнее всего, это обусловлено повышением экспрессии генов, кодирующих основные компоненты данной системы. Данный феномен следует рассматривать как компенсаторную реакцию.

Практическая значимость исследования состоит в разработке и верификации экспериментальной модели гипергликемии, которая в дальнейшем может использоваться другими исследователями для изучения влияния гипергликемии на функционирование как нервной системы, так и других систем организма беспозвоночных. Данные об изменениях электрической активности нейронов изолированных центральных ганглиев прудовика могут в дальнейшем использоваться в электрофизиологических исследованиях.

Результаты настоящего диссертационного исследования уже используются в учебном процессе кафедры физиологии человека и животных БГУ (акт № 204/380), они несомненно помогут улучшить фундаментальную подготовку будущих специалистов.

6. Опубликованность результатов диссертации в научной печати

По материалам диссертации опубликовано 24 работы: 8 статей в журналах (в том числе 6 из перечня ВАК Республики Беларусь для опубликования диссертационных исследований), 3 статьи в материалах конференций (в том числе 1 за рубежом), 13 тезисов докладов (5 за рубежом). Общий объём опубликованных материалов – 11,03 авторского листа (9,04 авторского листа подготовлено лично соискателем). Все основные результаты диссертации приведены в опубликованных работах.

Все основные результаты работы доложены и обсуждены на целом ряде республиканских и международных конференций: «Сигнальные механизмы регуляции физиологических функций» (Минск, Беларусь, 2017); 19th Conference of Junior Neuroscientists of Tübingen (Tübingen, Germany, 2018); «Фундаментальные и прикладные науки – медицине» (Минск, Беларусь, 2018); «Физико-химическая биология как основа современной медицины» (Минск, Беларусь, 2019); «Ломоносов» (Москва, Россия, 2019, 2021), «Взаимодействие нервной и иммунной систем в норме и патологии» (С.-Петербург, Россия, 2019); FENS Virtual Forum (2020).

Таким образом, по опубликованности и апробации результатов диссертация Шаденко А.Н. полностью соответствует п. 19 «Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий» ВАК Республики Беларусь.

7. Соответствие оформления диссертации требованиям ВАК

Структура диссертации полностью соответствует п. 5 Инструкции ВАК Республики Беларусь о порядке оформления квалификационной научной работы (диссертации) на соискание ученых степеней кандидата и доктора наук, автореферата и публикаций по теме диссертации, диссертация включает:

- титульный лист;
- раздел «Оглавление»;
- раздел «Перечень условных обозначений»;
- раздел «Введение»;
- раздел «Общая характеристика работы»;
- основная часть, включающую аналитический обзор литературы по теме исследования, главу с описанием материала и методов исследования, 4 главы собственных экспериментальных исследований и заключения;
- раздел «Библиографический список»;
- раздел «Приложения».

Автореферат также содержит все структурные элементы, предусмотренные данной инструкцией (общая характеристика, основная часть, заключение, список работ по теме диссертации, резюме).

Оформление диссертации и автореферата также полностью соответствует Инструкции ВАК Республики Беларусь о порядке оформления квалификационной научной работы (диссертации) на соискание ученых степеней кандидата и доктора наук, автореферата и публикаций по теме диссертации.

В диссертации выполнены требования пунктов 25–26 «Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий» ВАК Республики Беларусь; содержатся все необходимые ссылки на используемые литературные источники, а также публикации автора.

Диссертация написана грамотным научно-литературным языком, с правильным использованием научной терминологии. Все структурные элементы диссертации логически взаимосвязаны, в них полностью отражены цель и задачи исследования. Имеется минимальное количество технических и стилистических неточностей, которые не искажают смысл работы.

В процессе анализа содержания диссертации у меня возникли некоторые замечания и вопросы.

Замечания.

1. С. 56 – при оценке увеличения концентрации глюкозы в гемолимфе имеет место сравнение связанных групп данных, поэтому следует использовать критерий Уилкоксона либо sign test, а не критерий Манна – Уитни.

2. С. 74 – комментируя отсутствие статистически достоверного отличия по длительности реполяризации в группе экспериментальной гипергликемии в сравнении с контролем, автор утверждает «Такое положение, в отношении

фазы деполяризации, носит, на наш взгляд, несколько искусственный характер, определяемый применением соответствующих статистических методов». Данная фраза не вполне корректна.

3. Некоторые данные, приведенные в главе 6 (в частности, о кардиорегуляторных нейронах *Lymnaea stagnalis*) целесообразнее было бы дать в обзоре литературы.

4. Отмечены отдельные не вполне корректные выражения: удовлетворённость в АТФ (с. 16), синтез NO (с. 18), приложение глюкозы (с. 59).

5. Некоторые аббревиатуры, упоминаемые в тексте, следует дать в списке сокращений: FS клетки (с. 26), ч.д.а. (с. 34).

Вопросы.

1. С. 37 – может ли проназа, которой обрабатывают препараты нервной системы моллюсков, влиять на проницаемость мембраны для ионов и мембранную проводимость?

2. С. 48 – чем объяснить падение уровня глюкозы в гемолимфе животных, инкубированных в растворе глюкозы концентрации 10 мМ, через 2 ч после инкубации?

3. С. 64 – на основании чего утверждается о появлении внешних синаптических входов после добавления высоких концентраций глюкозы?

4. С. 82 – чем объяснить увеличение АФК-индуцированной флуоресценции с течением времени в обеих экспериментальных группах: опытной и контрольной?

5. Можно ли однозначно говорить об уменьшении оборонительного поведения моллюска, если мы наблюдаем увеличение втягивания тела в раковину? Являются ли изменения поведенческих реакций адаптивными либо дезадаптивными?

6. Может ли увеличение ЧСС у моллюсков при экспериментальной гипергликемии быть обусловлена прямым влиянием гипергликемии на пейсмейкерные клетки сердца, по аналогии с влиянием на нейроны?

7. Удалось ли Вам установить механизмы глюкозочувствительности нейронов *Lymnaea stagnalis* (в соответствии с заявленной целью)?

8. Насколько выявленные Вами закономерности могут быть применимы к позвоночным организмам?

8. Соответствие научной квалификации соискателя ученой степени, на которую он претендует

Диссертационная работа В.Н. Шаденко «Лабильность пептидергических нейронов центральных нервных ганглиев *Lymnaea stagnalis* при экспериментальной гипергликемии» является законченным, самостоятельно выполненным научным исследованием, которое вносит существенный вклад в фундаментальную и прикладную физиологию. Автор диссертационного исследования продемонстрировала навыки поиска и анализа литературных источников по заданной научной теме, умение

формулировать цель и задачи научного исследования, анализировать полученные данные и делать на их основе обоснованные выводы. В.Н. Шаденко успешно освоила и выполнила ряд современных методов исследования, в частности, электрофизиологические методы (регистрация электрической активности нейронов с помощью микроэлектродов), биохимические методы (измерение содержания глюкозы, активности компонентов антиокислительной защиты), методы клеточной биологии (измерение содержания активных форм кислорода в клетках с помощью флуоресцентных зондов). Также она показала навыки статистической обработки полученных в ходе экспериментов результатов с использованием современных параметрических и непараметрических методов.

Вышеуказанные замечания не перечёркивают основные выводы работы, не умаляют её достоинств, и носят в основном рекомендательный характер.

Таким образом, можно сделать вывод о полной соответствии научной квалификации соискателя ученой степени кандидата биологических наук.

Заключение

Диссертация Шаденко В.Н. «Лабильность пептидергических нейронов центральных нервных ганглиев *Lymnaea stagnalis* при экспериментальной гипергликемии», представляемая на соискание ученой степени кандидата биологических наук, является самостоятельно выполненной, завершенной научно-исследовательской работой, которая полностью соответствует требованиям п.п. 20, 21 Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий Высшей аттестационной комиссии Республики Беларусь, предъявляемым к кандидатским диссертациям. По профилю решаемых задач работа соответствует специальности 03.03.01 – физиология и отрасли биологические науки.

Автор работы, Шаденко Виктория Николаевна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.01 - физиология за новые, научно обоснованные результаты, включающие:

- разработку и верификацию модели экспериментальной гипергликемии, а также установление изменения интенсивности защитных реакций моллюсков на фоне умеренной стимуляции сердечных сокращений в условиях гипергликемии;

- выявление реакций нейронов *Lymnaea stagnalis* при быстром многократном возрастании уровня глюкозы в межклеточном пространстве, заключающихся в усилении частоты импульсации пептидергических нейронов кардиорегуляторной сети VD1/RPaD2 и её снижение в отношении серотонинергических нейронов LPeD1;

- установление особенностей реакции пептидергических нейронов на изменение возбудимости мембраны пептидергических нейронов VD1/RPaD2 в условиях пролонгированной



гипергликемии, которые заключаются в увеличении длительности фаз де- и реполяризации, значений амплитуды следовой гиперполяризации для нейронов RPaD1, удлинении фазы деполяризации и следовой гиперполяризации для пейсмейкерных мультипептидных нейронов VD1;

- обнаружении адаптационных механизмов в клетках нервных ганглиев *Lymnaea stagnalis*, направленных на активизацию системы антиокислительной защиты, спустя сутки после повышения содержания глюкозы в гемолимфе,

что в совокупности является решением важной научной задачи в области физиологии нервных процессов, расширяет современные представления о механизмах адаптации нервных клеток к условиям гипергликемии и сигнальных свойствах глюкозы в отношении центральных нейронов.

Заведующий кафедрой фармакологии
имени профессора М.В. Кораблёва
УО «Гродненский государственный
медицинский университет
доктор биологических наук, доцент

В.И. Козловский



 Подпись Козловский В.И. заверяю
 Старший инспектор по кадрам отдела кадров
 учреждения образования «Гродненский
 государственный медицинский университет»
 Ю.С. Моргис
 «12» 12 2022 г.