

ОТЗЫВ

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

Диссертационная работа В.Н. Шаденко «Лабильность пептидергических нейронов центральных нервных ганглиев *Lymnaea stagnalis* при экспериментальной гипергликемии» к защите представлена впервые и является собой завершенное квалификационное исследование, посвященное изучению способности нейронов к восприятию повышенного содержания глюкозы из межклеточного пространства и установлению механизмов чувствительности к глюкозе центральных нервных ганглиев, не входящих в состав пищевой сети моллюска *Lymnaea stagnalis*.

Соответствие диссертации специальности и отрасли науки, по которой она представляется к защите

Диссертационная работа В.Н. Шаденко «Лабильность пептидергических нейронов центральных нервных ганглиев *Lymnaea stagnalis* при экспериментальной гипергликемии» по тематике, методологии, объекту и предмету исследования, целям и задачам, положениям, выносимым на защиту, базовому образованию соискателя соответствует пункту I (отрасль науки, по которой присуждается учёная степень – биологические науки), пункту II (формула специальности – физиология; изучение механизмов функционирования здорового организма, его структурных элементов 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) и разделам области исследований 1; 2; 8; 19; 20-23 (механизмы регуляции функций организма человека и животных; контроль гомеостазиса; физиология нервной системы; интегративная деятельность: сенсорные системы, высшая нервная деятельность, адаптация; физиология движений и локомоции; влияние факторов внешней среды на живые организмы; экспериментальный анализ закономерностей протекания физиологических процессов; моделирование функциональных состояний) пункта III, паспорта специальности 03.03.01 – физиология, утвержденного Приказом ВАК Республики Беларусь от 6 марта 2018 г., №64.

Соблюдается разграничение со специальностью 14.03.02 – патологическая физиология, поскольку изучению подлежали закономерности регуляции в протекании физиологических процессов в здоровом организме модельного нейробиологического объекта, моллюска *Lymnaea stagnalis*.

Актуальность темы диссертации

В настоящее время в исследованиях физиологии нервной системы наряду с традиционными биологическими моделями первого порядка (млекопитающие), активно используют биологические модели второго порядка (гидробионты, бактерии и т.п.). В природе моллюски *Lymnaea stagnalis* обитают в пресных водоемах. Они неприхотливы и малозатратны при содержании в условиях лаборатории. Нервная система прудовиков включает в себя гигантские нейроны, расположение которых хорошо задокументировано и позволяет выявлять индивидуальные свойства отдельных нейронов. Известно, что даже один гигантский нейрон моллюска способен осуществлять функции, которые у других животных выполняют большие сложно организованные структуры, включающие значительное количество клеток нервной ткани. Кроме того, увеличение уровня глюкозы во внеклеточном пространстве, достигаемое экспериментальным путем, в отличие от млекопитающих, не сопровождается комплексом метаболических, неврологических нарушений, не вызывает и значимых проблем в углеводном обмене исследуемого гидробиона. Колебания уровня глюкозы в гемолимфе беспозвоночных носят регуляторный характер, поскольку в составе нервных ганглиев у моллюсков есть нейросекреторные клетки, высвобождающие, в том числе и инсулин-подобные вещества, утилизирующие глюкозу в ходе роста, развития или размножения. Поэтому выбор моллюска *Lymnaea stagnalis* в качестве модельного объекта является адекватным поставленным в исследовании задачам.

Изучение фундаментальных физиологических свойств нервной ткани, таких как лабильность, имеет свои истоки в работах известного русского физиолога Н.Е. Введенского. В классическом понимании лабильность отражает время, в течение которого ткань восстанавливает работоспособность после очередного цикла возбуждения. Исследования лабильности работы нервных центров и сенсорных анализаторов, направлены на уточнение механизмов изменчивости физиологических состояний при моделировании значительных колебаний показателей гомеостаза. В диссертационной работе В.Н. Шаденко одним из актуальных показателей выбрана концентрация глюкозы. При этом автор исследования привела обоснования ее роли, как фактора объемной передачи сигналов в нервной ткани моллюсков. Соискатель акцентировала внимание на нейронах, содержащих низкомолекулярные нейромедиаторы, не

связанные с реализацией пищевого поведения и/или усилением анаболических процессов. Ей удалось экспериментальным путем установить изменение электрических характеристик FMRF-амидергических нейронов RPaD1 (обработка и передача различной сенсорной информации, регуляция биения сердца и втягивание тела животного в раковину) и мультипептидергических пейсмейкерных нейронов VD1, электрически взаимодействующих с RPaD2 (стимуляция сокращений сердца, лёгочного дыхания; кардиореспираторная сеть), по сравнению с клетками дыхательной (дофаминергический нейрон RPeD1) и локомоторной (серотонинергический нейрон LPeD1) сетей нервной системы прудовиков. Следует отметить, что изменение лабильности кардиорегуляторных пептидсодержащих нейронов (RPaD1, VD1/RPaD2) центральных нервных ганглиев, под действием глюкозы, впервые продемонстрировано в представленной к защите диссертационной работе.

Выявление подобной избирательности предполагает возможность моделирования процессов, для создания принципиально новых бионических устройств, в том числе и медицинского назначения. Высокая лабильность нервной ткани моллюска к значительному возрастанию глюкозы в гемолимфе обеспечивается механизмами модификации мембранный натриевой и калиевой проводимостей, увеличивающих возбудимость данных нейронов и систем антиоксидантной защиты, что инициирует выброс нейропептидов, обладающих регуляторным влиянием, в том числе, и в отношении двигательных (моторных) систем, обеспечивая условия для утилизации избытка глюкозы во внутренней среде на текущие нужды организма, достигая оптимального приспособительного результата.

Интересный факт снижения оборонительных рефлексов прудовика в модели гипергликемии в определенной степени позволяет предположить о том, что глюкоза, действуя в качестве метаболического сигнала, все же снижает адаптивный потенциал.

Таким образом, с учётом значимости фундаментальных исследований в области физиологии нервной системы для решения задач как теоретической, так и практической направленности, диссертацию В.Н. Шаденко следует признать актуальной.

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

В.Н. Шаденко впервые установлены факты влияния многократного повышения в интерстиции нервной ткани прудовика уровня глюкозы на характер электрической активности кардиорегуляторных пептидсодержащих нейронов (RPaD1, VD1/RPaD2) и изменений электрических свойств их мембран. Что является следствием модификации их возбудимости, снижении

мембранного потенциала и усилении частоты импульсации при модификации временных характеристик потенциалов действия. Обнаружено, что скорость деполяризации, а также натриевая и калиевая проводимость мембран пептидергических нейронов моллюсков зависят от уровня внеклеточной глюкозы. Эти механизмы лежат в основе адаптации клеток ЦНС беспозвоночных к действию высоких концентраций глюкозы.

Резкое повышение содержания глюкозы в гемолимфе приводит к модификации редокс-равновесия в ткани нервных ганглиев, но его начальные эффекты не связаны с накоплением АФК в цитоплазме нейронов, что указывает на существование адаптационных механизмов, направленных на нейтрализацию эффектов, связанных с возрастанием количества высокоэнергетических субстратов в окружающем нервные клетки пространстве. Исследованные процессы отражаются на поведении моллюсков: у них фиксируют снижение оборонительных реакций и умеренную стимуляцию сердечной деятельности.

Полученные экспериментальные данные позволили выдвинуть четыре положения, выносимых на защиту:

1. Инкубация животных в высококонцентрированном растворе глюкозы приводит к развитию экспериментальной гипергликемии, сопровождаемой многократным возрастанием уровня глюкозы в гемолимфе (при неизменности её содержания в других органах моллюска), уменьшая выраженность оборонительного поведения *Lymnaea stagnalis*;

2. Пептидергические (RPaD1, VD1/RPaD2), кардиорегуляторные нейроны центральных нервных ганглиев *Lymnaea stagnalis* оказываются наиболее чувствительными элементами, реагирующими на повышение уровня глюкозы в окружающем ЦНС пространстве, по сравнению с серотонин- (LPeD1) и дофамин- (RPeD1) эргическими клетками локомоторной и дыхательной нейронных сетей;

3. Длительное (часы) действие высоких (10 мМ) концентраций глюкозы связано с изменением возбудимости, а также преимущественно временных показателей спайков пептидсодержащих нейронов (RPaD1, VD1/RPaD2) ЦНС *Lymnaea stagnalis* и носит универсальный характер для исследованных клеток;

4. Резкое, многократное возрастание содержания глюкозы в интерстиции не вызывает незамедлительного накопления АФК в цитоплазме клеток нервных ганглиев *Lymnaea stagnalis* и не изменяет характеристики их антиокислительной защиты, но приводит к модификации редокс-равновесия в ЦНС в отдалённой (сутки) перспективе.

Все положения, выносимые на защиту, являются новыми. Они имеют обоснование в экспериментальных исследованиях, опубликованы в рецензируемых журналах и, по сути, представляют вклад в развитие фундаменталь-

ных представлений о лабильности пептидергических нейронов центральных нервных ганглиев *Lymnaea stagnalis*.

Обоснованность и достоверность выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Результаты экспериментальных исследований, представленные в диссертации, информативны и могут быть легко воспроизведены в других лабораториях, что служит аргументом в пользу наличия достаточной доказательной базы в подтверждение положений, выносимых на защиту.

Достоверность выводов, заключений и рекомендаций диссертации не подлежит сомнению и основана на достаточном объеме проведенных исследований (101 моллюск, 198 проб гемолимфы, 138 проб гомогенатов ЦНС, печени, стенки тела и электрических реакций от 82 исследованных идентифицированных нейронов). В целом исследования выполнены на высоком методическом уровне с применением электрофизиологических, биохимических и поведенческих методов, поэтому достоверность их не вызывает сомнений. Выводы логично вытекают из анализа результатов исследования. Рекомендации достаточно полно отражают допустимые сферы применения полученных данных.

Научная значимость диссертации

Научная значимость диссертационного исследования подтверждена государственной экспертизой научно-исследовательских работ, проводимых на кафедре физиологии человека и животных Белорусского государственного университета. Тема исследования соответствует приоритетным направлениям научных исследований Республики Беларусь на 2016–2020 годы (утверждены постановлением Совета Министров Республики Беларусь от 12.03.2015, № 190) – «4. Медицина и фармация» и «12. Междисциплинарные исследования». Работа выполнена в рамках научно-исследовательских проектов «Мембранные механизмы возрастных изменений нейронов разной эргичности» (ГПНИ «Фундаментальные и прикладные науки – медицине», 2016–2018 гг., № ГР 20161315) и «Разработка и создание учебно-методического комплекса по нейробиологии» (ГПНИ «Конвергенция-2020», 2016–2020 гг., № ГР 20161893).

В диссертационном исследовании В.Н. Шаденко разработала и верифицировала модель экспериментальной гипергликемии; в этих условиях идентифицировала восприимчивые к однократному или многократному повышению уровня глюкозы в межклеточном пространстве нейроны центральных нервных ганглиев; выявила изменения паттерна спонтанной активности, электрические свойства мембран, временные и амплитудные характеристики

потенциалов действия нейронов; изучила способность к накоплению активных форм кислорода и состояние редокс-равновесия в клетках центральных нервных ганглиев *Lymnaea stagnalis*, реагирующих на длительную экспозицию глюкозы. Особенности сопряжения электрической активности и антиоксидантной защиты пептидергических нейронов кардиорегуляторных и оборонительных нейронных сетей, при экспериментальном моделировании гипергликемических процессов, служат раскрытию механизмов влияния глюкозы на рефлекторную деятельность нервных центров, не входящих в состав пищевой сети моллюсков.

Результаты, характеризующие изменение характера вызванной и спонтанной электрической активности в гигантских дофаминергических нейронах правого педального ганглия (RPeD1, от *right pedal dorsal 1*), серотонинергических нейронах левого педального ганглия (LPeD1, от *left pedal dorsal 1*), пептидсодержащих нейронах правого париетального ганглия (RPaD1, от *right parietal dorsal 1*) и пары электрически связанных пептидсодержащих нейронов висцерального и правого париетального ганглиев (VD1/RPaD2, от *visceral dorsal 1* и *right parietal dorsal 2*) на присутствие повышенной концентрации глюкозы в гемолимфе, являются основой для понимания процессов, происходящих в центральной нервной системе позвоночных.

В соответствии с этим, результаты, имеют, важное теоретическое значение для нейрофизиологии.

Практическая значимость результатов диссертации

Работа, выполненная В.Н. Шаденко, имеет фундаментальное значение и практическое применение, достаточно обоснованное для образовательного и научно-исследовательского процесса. Следует отметить, что важнейшие результаты изложены в виде устных докладов и обсуждены на международных и республиканских научных конференциях и опубликованы в виде статей в сборниках и тезисов.

Поскольку практическая значимость работы является потенциальной, полученные в диссертационной работе результаты позволяют рекомендовать использовать алгоритм исследований для идентификации у прудовиков других нейронов, универсальным образом реагирующих в ответ на изменение иных констант гомеостазиса.

Грамотно изложенные материалы и методы исследования, будут интересны начинающим исследователям, а полученные данные – широкому кругу читателей. Результаты исследования внедрены в учебный процесс кафедры физиологии человека и животных БГУ (акт № 204/380). Данные, полученные В.Н. Шаденко, послужат для повышения качества подготовки квалификационных (курсовые, дипломные) работ, организации самостоятельной научно-

исследовательской практики студентов и магистрантов учреждениях образования биологического и медико-биологического профилей. Включение новых знаний о физиологических и поведенческих особенностях прудовиков заинтересуют зоологов, гидробиологов, этологов, а будучи использованными при чтении курсов «Физиология человека и животных», «Биофизика», «Сравнительная физиология», «Нейробиология» способствуют росту исследовательского интереса слушателей и формированию профессиональных навыков будущих ученых.

Экономическая значимость и социальная значимость

Проведенное диссертационное исследование носит экспериментальный характер и направлено на расширение знаний в области нейрофизиологии центральной нервной системы.

Учитывая значительную лабильность нервной ткани исследуемых моллюсков, открываются перспективы моделирования и создания бионических систем, в том числе, и для биомедицинских приложений, потенциально могут быть использованы и для анализа причин развития метаболических заболеваний и их ранней диагностики на основании модификации паттернов поведения.

Социально-экономическое значение диссертационного исследования заключается в улучшении качества образовательных услуг, включая и платные, и для зарубежных обучающихся, которые оказывают высшие учебные заведения нашей страны. Подобные примеры диссертационных исследований, имеющих логичную структуру и четкие выводы, способствуют формированию научных школ, развивающих новые и передовые научные направления.

Опубликованность результатов диссертации в научной печати

Соискателем по теме диссертации опубликовано 24 работы: 8 статей в журналах из перечня научных изданий Республики Беларусь для опубликования диссертационных исследований, из них 2 статьи опубликованы в международных изданиях, входящих в базу данных Web of Science; 3 статьи в сборниках работ и материалах конференций (1 за рубежом), 13 тезисов докладов (5 за рубежом). Общий объем опубликованных материалов – 11,03 авт. л. (9,04 авт. л. подготовлено лично соискателем).

Это согласуется с критериями, рекомендованными ВАК для кандидатских диссертаций. Содержание автореферата в полной мере следует тексту диссертации.

Соответствие оформления диссертации требованиям ВАК

Диссертация, а также автореферат оформлены в соответствии с требованиями «Положения о присуждении ученых степеней и присвоения ученых званий» ВАК Республики Беларусь. Иллюстрации дополняют текстовую часть работы, таблицы в полном объеме представляют полученные экспериментальные данные. Достоверность полученных результатов не вызывает сомнений.

Рукопись представлена в объеме 130 страниц (из них 98 – основной текст) и состоит из введения, общей характеристики работы, аналитического обзора литературы, описания материалов и методов исследования, собственных результатов (3 главы), их обсуждения (1 глава), заключения, библиографического списка, включающего 274 источника (19 на русском и 255 на английском языках) и 24 публикаций соискателя, приложения. Рукопись работы содержит 29 рисунков и 5 таблиц.

Соответствие научной квалификации соискателя ученой степени, на которую он претендует

Исходя из анализа текста диссертации и автореферата, а также опубликованных соискателем работ, выступлений на конференциях и симпозиумах, можно заключить, что научная квалификация В.Н. Шаденко полностью соответствует требованиям, предъявляемым к соискателям ученой степени кандидата биологических наук.

По ходу изложения отмечены отдельные неточности в орфографии, которые не влияют на восприятие материала. Работа интересно написана, в доступной форме, графический материал полностью отражает важнейшие результаты.

Вопросы, уточняющего характера и замечания к представленной работе:

1. Интересный факт снижения оборонительных рефлексов прудовика в модели гипергликемии вызывает вопросы о последствиях повышенного уровня глюкозы: ухудшает адаптивный потенциал организма или же улучшает приспособительный результат в долгосрочной перспективе?

2. Насколько эксперимент с погружением прудовика в высококонцентрированный раствор глюкозы воспроизводит ситуацию, с которой этот моллюск может столкнуться в естественной среде обитания? Сколько глюкозы должно быть в окружающей среде, чтобы в гемолимфе и интерстиции прудовика можно было определить 10 мМ или 100 мМ глюкозы?

3. Способны ли нейроны усвоить концентрации глюкозы, превышающие ее нормальный уровень для данного биологического объекта? Что происходит с избытком глюкозы?

4. Поясните, на какие текущие нужды организм моллюска может потребовать полученный извне избыток глюкозы в гемолимфе? Насколько быстро происходит подобный процесс утилизации? Откуда у прудовиков такой широкий диапазон адаптации к глюкозе?

5. Наблюдаемые модификации реагирования нервных центров моллюсков на повышение глюкозы следует отнести к метаболическим или сигнальным?

6. При какой концентрации глюкозы предполагается или известна из сведений научной литературы гибель экспериментальных особей? Планируете ли в будущем исследовать дозозависимый характер полученных эффектов глюкозы у моллюсков?

7. Отреагируют ли пептидергические (RPaD1, VD1/RPaD2), кардиорегуляторные нейроны центральных нервных ганглиев *Lymnaea* на снижение уровня глюкозы в окружающем ЦНС пространстве?

8. Для оценки антиоксидантной защиты у прудовиков определяли супероксиддисмутазу, активные продукты тиобарбитуровой кислоты (ТБК-активные продукты), Se-зависимую глутатионпероксидазу, γ -глутамилцистеинилглицин восстановленный. Информативными были бы показатели каталазы, глутатионредуктазы и т.п.?

9. Если планируете дальнейшие исследования, конкретизируйте, как на основании разработанных моделей экспериментальной гипергликемии можно будет оценивать влияние глюкозы на когнитивные функции мозга беспозвоночных. Уточните, как оценивают когнитивные функции исследуемого вида моллюсков в норме, без моделирования гипергликемии?

10. Влияет ли 100 мМ водный раствор глюкозы на осмотическое давление среды?

11. Планируете ли продолжение исследования и расширение прикладных аспектов применения полученных результатов?

12. По частоте встречаемости в тексте диссертационного исследования кардиореспираторная сеть используется 3 раза, а кардиорегуляторная сеть (нейроны, клетки) 10 раз. Кардиореспираторная и кардиорегуляторная сети нейронов имеют функциональные отличия? Это синонимичные термины?

13. Сокращение для γ -глутамилцистеинилглицина восстановленного представлено как Г-SH, что немного затруднило его расшифровку. Желательно использовать или как GSH или полностью русские буквы.

14. В пункте диссертации и автореферате (в п.3) в положениях, выносимых на защиту в наименовании объекта исследований *Lymnaea stagnalis*, вероятно при корректуре в типографии, осталось только наименование рода *Lymnaea*.

15. В положениях, выносимых на защиту нет упоминания об эффектах 100 мМ глюкозы, вероятно, они подразумеваются под словами «высокие концентрации».

Указанные замечания не оказывают существенного влияния на положительную оценку рецензируемой диссертационной работы.

В целом, рецензируемая диссертация выполнена квалифицированно на высоком научно-методическом уровне, по оформлению и содержанию соответствует нормативным требованиям ВАК Республики Беларусь. Цель и задачи диссертационной работы выполнены.

Заключение

По актуальности темы, методическим подходам, новизне полученных результатов, их несомненной фундаментальной и прикладной значимости, содержанию и оформлению диссертация В.Н. Шаденко удовлетворяет условиям, предусмотренным пунктами 20, 21 «Положения о присуждении ученых степеней и присвоения ученых званий» ВАК Беларуси и соответствует требованиям, предъявляемым ВАК Беларуси к кандидатским диссертациям. Она также соответствует специальности 03.03.01 – «физиология».

Автор диссертационного исследования **Виктория Николаевна Шаденко** по своей профессиональной подготовленности, умению работать с литературой, способности ставить и решать конкретные физиологические задачи заслуживает присвоения ученой степени кандидата биологических наук по указанной специальности за новые научно обоснованные результаты, включающие:

- разработку новой экспериментальной модели гипергликемии, верифицированной по возрастанию уровня глюкозы в гемолимфе и неизменности её содержания в других органах, с характерным уменьшением выраженности оборонительного поведения *Lymnaea stagnalis*;

- выявление чувствительных к повышению уровня глюкозы пептидергических (RPaD1, VD1/RPaD2), кардиорегуляторных нейронов центральных нервных ганглиев, но не в серотонин- (LPeD1) и дофамин- (RPeD1) эргических нейронах локомоторной и дыхательной нейронных сетей *Lymnaea stagnalis*;

- установление универсального характера показателей возбудимости и лабильности пептидергических нейронов (RPaD1, VD1/RPaD2) *Lymnaea stagnalis* в условиях длительного действия (часы) глюкозы, в концентрации 10 мМ;

- изучение динамики адаптационных резервов антиоксидантной защиты *Lymnaea stagnalis* при экстремальном и многократном возрастании содержа-

ния глюкозы в интерстиции и выявление отсроченных эффектов в модификации редокс-равновесия в нервных ганглиях *Lymnaea stagnalis*,

что в совокупности представляет собой новые данные в области физиологии нервной системы.

Официальный оппонент
заведующий лабораторией
нейрофизиологии Института
физиологии НАН Беларуси,
кандидат биологических наук, доцент

С. Г. Пашкевич

