

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 212.166.21,
СОЗДАНОГО НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО
АВТОНОМНОГО ОБРАЗОВАТЕЛЬНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ ВЫСШЕГО
ОБРАЗОВАНИЯ «НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
НИЖЕГОРОДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМ. Н.И. ЛОБАЧЕВСКОГО» МИНИСТЕРСТВА НАУКИ И ВЫСШЕГО
ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ, ПО ДИССЕРТАЦИИ
НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 10.10.2019 г. № 6

О присуждении Астрахановой Татьяне Александровне, гражданину
РФ, ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Механизмы BDNF-опосредованной адаптации нервной системы к действию гипоксии» по специальности **03.03.01 — физиология** принята к защите 06.06.2019, протокол №4, диссертационным советом Д 212.166.21, созданным на базе федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (603950, г. Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23, приказ Минобрнауки РФ № 1256/нк от 14.10.2016).

Соискатель, Астраханова Татьяна Александровна, 1992 года рождения. В 2015 г. Астраханова Татьяна Александровна окончила специалитет федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского» по специальности «Биология». Астраханова Татьяна Александровна с 2015 по 2019 гг. освоила программу подготовки научно-педагогических кадров в очной аспирантуре федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского» по специальности «Биофизика» (год окончания — 2019). В настоящее время Татьяна Александровна работает в лаборатории по разработке методов нейропротекции Центра трансляционных технологий ФГАОУ ВО

«Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского» в должности младшего научного сотрудника.

Диссертация выполнена на кафедре нейротехнологий Института биологии и биомедицины ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации

Научный руководитель — доктор биологических наук, профессор кафедры нейротехнологий Института биологии и биомедицины ННГУ им. Н. И. Лобачевского Ведунова Мария Валерьевна.

Официальные оппоненты:

Белослудцев Константин Николаевич – доктор биологических наук по специальности 03.01.02 – «Биофизика», профессор кафедры биохимии, клеточной биологии и микробиологии, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Марийский государственный университет (МАГУ), г. Йошкар-Ола Республики Марий Эл;

Науменко Владимир Сергеевич

доктор биологических наук по специальности 03.03.01 – «Физиология», заведующий лабораторией нейрогеномики поведения, федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (ИЦиГ СО РАН) г. Новосибирск, Новосибирская обл.;

дали положительные отзывы на диссертацию.

В положительном отзыве официального оппонента д.б.н. Белослудцева Константина Николаевича отмечено, что диссертационная работа, вне всякого сомнения, выполнена на актуальную тему на современном методическом уровне, содержит новые серьезные научные результаты, имеющие важное развитие для современной физиологии, биохимии, биофизики, и клеточной биологии. Работа соответствует требованиям «Положения о порядке присуждения учёных степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. №842, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.01 – физиология.

В качестве замечаний и вопросов отмечено следующее:

1. В работе не описано, с чем связаны выбранные дозы BDNF при введении его животным (4 мкг/кг) и клеткам (1 нг/мл). Как эти дозы соотносятся с тем, что есть в организме и с тем уровнем оверэкспрессии, который был стимулирован вирусным конструктором.

2. К сожалению, в работе не приведены некоторые контрольные эксперименты (как то одновременное введение BDNF и ANA животным), которые позволили бы еще точнее расшифровать описанные в работе механизмы.

3. С чем связаны столь высокие скорости дыхания митохондрий мозга мышей (например, на рис. 22, 24, 29). Несмотря на то, что данные значения не влияют на интерпретацию полученных результатов, данные значения не совсем соотносятся с литературными данными по дыханию митохондрий мозга.

4. При исследовании животных с различной устойчивостью к гипоксии не очень корректно их сравнивать с группой «интактные животные». Популяция животных всегда содержит высоко-, средне- и низко-устойчивых животных и эпизод гипоксии лишь детектирует эти группы. Поэтому интактные животные включают в себя все три группы животных. Поэтому правильно было бы сначала разделить животных по устойчивости, а затем через месяц провести у части животных повторный эпизод острой гипобарической гипоксии и уже попарно сравнивать данные группы.

5. В работе встречаются стилистические ошибки и упущения. В частности, отсутствуют ссылки на ряд рисунков в литературном обзоре. Некорректно переведен термин RCI (Respiratory control index) – респираторный контрольный индекс. Правильный перевод индекс дыхательного контроля (или просто дыхательный контроль. Кроме того, определение гипоксии Чарного (страница 27) не является наиболее удачным: «Патологическое состояние, наступающее в организме при неадекватном снабжении тканей и органов кислородом или при нарушении утилизации в них кислорода». Гипоксия все ж таки более общее явление и сводить его к данному определению не очень правильно.

В положительном отзыве официального оппонента Науменко Владимира Сергеевича отмечено, что проведенное детальное и разностороннее исследование представляется весьма целесообразным и актуальным. Диссертационная работа имеет высокую фундаментальную и практическую значимость. По объему и структуре, актуальности,

поставленной цели и задачам, объему проведенных исследований, новизне полученных результатов, их научной и практической значимости, достоверности полученных результатах, обоснованности выводов и положений, выносимых на защиту, диссертация представляет завершённую научно-квалификационную работу, выполненную на высоком методическом уровне. Диссертационная работа полностью соответствует требованиям «Положения о порядке присуждения учёных степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года, а её автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.01 – физиология.

В качестве замечаний отмечено следующее:

1. Не достаточно обоснован выбор NFκB фактора, среди множества регулируемых BDNF транскрипционных факторов.

2. Из главы материалы и методы и рисунка 10 не ясно, каким образом экспрессируется использованный в работе генетический конструкт: отделен ли каким-либо образом флуоресцентный белок от гена BDNF. С большой долей вероятности нахождение на С-конце нейротрофического факторы большого флуоресцентного белка существенно ухудшит свойства BDNF. С этим может быть связан слабый эффект AAV-BDNF на функциональное состояние митохондрий головного мозга.

3. На рисунке 13 (схема эксперимента) показано только введение ANA12. Проводили ли этот эксперимент с BDNF и AAV-BDNF?

4. Рисунок 14. Нет группы с ANA-12.

5. Рисунок 15. Не указан момент введения BDNF.

6. Глава 2.3.2. и 2.4.1. Вместо g указаны обороты в минуту без указания радиуса ротора.

7. Глава 2.4.1. Обеспечение жизнеспособности клеточных культур. Точно ли клетки культивировались при 35,5 °C? 5% CO?

8. Как оценивали количество клеток?

9. Также имеется ряд недочетов стилистического характера

Тем не менее, приведенные замечания не снижают значения проделанной работы

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт Высшей Нервной Деятельности и Нейрофизиологии РАН, г. Москва, в своем положительном отзыве, подписанном **Гуляевой Наталией Валерьевной**, проф., д.б.н., гл.н.с., рук.

лаб. функциональной биохимии нервной системы ИВНД и НФ РАН, указала, что диссертационная работа Астрахановой Татьяны Александровны «Механизмы BDNF-опосредованной адаптации нервной системы к действию гипоксии» является законченной научно-квалификационной работой. Работа выполнена самостоятельно, на высоком научно-исследовательском уровне, что свидетельствует о значительном вкладе автора в теоретические и практические аспекты разрабатываемой темы. В диссертации содержатся новые сведения о механизмах антигипоксического действия нейротрофического фактора головного мозга, основанные на современных методах исследования.

В отзыве ведущей организации отмечено, что содержание диссертации соответствует специальности 03.03.01 – физиология (биологические науки). Результаты исследований, изложенные Т.А. Астрахановой в диссертационной работе, соответствуют «Положению о присуждении ученых степеней», утвержденному Постановлением правительства РФ от 24.09.2013 г. №842 (ред. 29.05.2017 г.) «О порядке присуждения ученых степеней», пп. 9 – 14.

Основные научные результаты диссертации опубликованы в рецензируемых ВАК журналах, что соответствует пп. 11 – 13 Постановления Правительства РФ от 24.09.2013 г. №842 (ред. 29.05.2017 г.) «О порядке присуждения ученых степеней» и Перечню рецензируемых изданий, размещенных на официальном сайте ВАК.

Диссертация полностью соответствует критериям пп. 9 – 14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденному Постановлением правительства РФ от 24.09.2013 г. №842 (ред. 29.05.2017 г.) и включает все необходимые элементы научно-квалификационной работы уровня кандидата биологических наук.

Таким образом, по актуальности, новизне, научной и практической значимости, объему исследований и анализу полученных результатов диссертационная работа полностью соответствует требованиям «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденному Постановлением правительства РФ от 24.09.2013 г. №842, а ее автор Астраханова Татьяна Александровна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.01 – физиология (биологические науки).

В качестве замечания указано на отсутствие в методической части работы раздела, посвященного использованным методам статистики и обоснованию их использования. При изложении результатов используемые методы статистического анализа указаны, однако оптимальным был бы отдельный раздел в методической части. Есть ряд замечаний к стилистике, использованию кальк с английского языка. Например, исследована опосредованная BDNF, а не «BDNF-опосредованная» адаптация. Однако эти замечания не снижают положительного впечатления от работы, содержащей добротный экспериментальный материал.

Соискатель имеет 32 опубликованные работы, все из них по теме диссертации, из них: 7 статей, опубликованных в научных журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты на соискание ученой степени кандидата биологических наук, 24 работы в научных журналах, сборниках научных статей и материалах конференций (14 международных, 10 всероссийских), 1 учебно-методическое пособие. Опубликованные работы посвящены исследованию антигипоксического действия BDNF при моделировании гипоксии *in vivo* и *in vitro*, и в полной мере отражают результаты диссертационного исследования.

Общий объем научных изданий по теме диссертации составляет 157 страниц, а авторский вклад соискателя составляет более 80 %. Недостоверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени работах, в которых изложены основные научные результаты диссертации, в диссертации Астрахановой Т.А. отсутствуют.

Наиболее значимые научные работы по теме диссертации:

1. Ведунова М.В., Сахарнова Т.А., Митрошина Е.В., Шишкина Т.В., **Астраханова Т.А.**, Мухина И.В. Антигипоксические и нейропротективные свойства нейротрофических факторов BDNF и GDNF при гипоксии *in vitro* и *in vivo* // Современные технологии в медицине. – 2014. – Т. 6 (4). – С. 38 – 47.
2. Ведунова М.В., Шишкина Т.В., Мищенко Т.А., Митрошина Е.В., **Астраханова Т.А.**, Пимашкин А.С., Мухина И.В. Нейропротективное и антигипоксическое действие глиального нейротрофического фактора (GDNF) при моделировании гипоксии в культурах диссоциированных клеток гиппокампа // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2016. – №1. – С. 33 – 39.

3. Митрошина Е.В., Абогессименгане Б.Ж., Уразов М.Д., Хамрауй И., Мищенко Т.А., **Астраханова Т.А.**, Щелчкова Н.А., Лапшин Р.Д., Шишкина Т.В., Белоусова И.И., Мухина И.В., Ведунова М.В. Адаптационная роль глиального нейротрофического фактора при ишемии головного мозга // Современные технологии в медицине. – 2017. – Т. 9(1) – С. 68 – 77.
4. Мищенко Т.А., Митрошина Е.В., Шишкина Т.В., **Астраханова Т.А.**, Прохорова М.В., Ведунова М.В. Применение методики прижизненного детектирования экспрессии мРНК в сочетании с кальциевым имиджингом для исследования нейросетевой активности *in vitro* // Биологические мембраны. – 2018. – Т. 35. – №2. – С. 104 – 114.
5. **Астраханова Т.А.**, Уразов М.Д., Усенко А.В., Митрошина Е.В., Мищенко Т.А., Щелчкова Н.А., Ведунова М.В. BDNF – опосредованная регуляция функционального состояния митохондрий клеток головного мозга в условиях гипоксии // Современные технологии в медицине. – 2018. – Т. 10. – № 3. – С. 88 -94.
6. Уразов М.А., **Астраханова Т.А.**, Усенко А.В., Мищенко Т.А., Щелчкова Н.А., Кравченко Г.А., Ведунова М.В., Митрошина Е.В. Влияние пренатальной гипоксии на функциональное состояние // Современные технологии в медицине. – 2019. – Т.10. – № 4. С. 60 – 68.
7. Mishchenko T.A., Mitroshina E.V., Usenko A.V, Voronova N.V, **Astrakhanova T.A**, Shirokova O.M., Kastalskiy I.A., Vedunova M.V. Features of Neural Network Formation and Their Functions in Primary Hippocampal Cultures in the Context of Chronic TrkB Receptor System Influence // Front. Physiol. – 2019. – V.9. – № 1925. P. 1-17.

Указанные публикации входят в перечень ВАК или международные реферативные базы данных и системы цитирования Web of Science и Scopus.

На диссертацию и автореферат поступило 4 отзыва, все положительные, без замечаний. В отзывах указывается, что представляемая работа характеризуется высоким теоретическим и экспериментальным уровнем, по своей новизне и актуальности имеет большое научное и практическое значение, соответствует требованиям Высшей аттестационной комиссии. Отзывы получены из:

1. ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации за подписью кандидата биологических наук, доцента

кафедры биохимии с курсами медицинской и фармацевтической химии, ведущего научного сотрудника НИИ молекулярной медицины и патобиохимии **Пожиленковой Елены Анатольевны**, без замечаний;

2. ФГБОУ ВО «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева» за подписью доктора биологических наук, профессора, заведующего кафедрой биотехнологии, биоинженерии и биохимии **Ревина Виктора Васильевича**, без замечаний;

3. ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»» за подписью кандидата биологических наук, научного сотрудника лаборатории фотосинтетического электронного транспорта Института фундаментальных проблем биологии РАН **Ветошкиной Дарьи Васильевны**, без замечаний;

4. ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» за подписью кандидата биологических наук, ведущего научного сотрудника Института биофизики клетки РАН **Шарапова Марса Галиевича**, без замечаний.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается их соответствием критериям требований, изложенных в пп. 22 и 24 «Положения о присуждении учёных степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. №842: являются компетентными по заявленной в диссертации специальности, имеют профильные публикации по проблеме диссертационного исследования и способны объективно оценивать актуальность темы диссертации, а также достоверность, теоретическую значимость и научно-практическую ценность полученных в работе результатов (сведения о них размещены на официальном сайте ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского» (<https://diss.unn.ru/927>)).

Диссертационный совет отмечает, что в результате выполненных соискателем исследований:

- **выявлены** особенности митохондриально-опосредованного действия BDNF на адаптацию нейронных сетей к действию гипоксии на основе регистрации параметров функционирования дыхательной цепи митохондрий клеток головного мозга (*in vivo*), нейрон-глиальной сети (*in vitro*);

- **показан** нейропротективный эффект нейротрофического фактора BDNF в условиях сниженного содержания кислорода;

- **доказано** наличие связи между концентрацией нейротрофического фактора головного мозга (BDNF) и устойчивостью к гипоксии.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

- **обоснованы** полученные в работе данные о действии нейротрофического фактора головного мозга на метаболизм митохондрий в условиях гипоксии, которые расширяют теоретические представления о механизмах нейропротективного действия BDNF в стрессовых условиях и углубляют понимание его молекулярных механизмов;

- **изложены** теоретические положения, дополняющие имеющиеся знания о роли BDNF в адаптации нервной системы к действию гипоксии;

- **раскрыт** путь влияния нейротрофического фактора головного мозга на функциональную активность митохондрий посредством TrkB-рецепторов;

- **изучены** функциональная реакция дыхательной цепи митохондрий и функциональная кальциевая активность клеток головного мозга в условиях гипоксии и при применении BDNF на фоне гипоксии;

- **охарактеризованы** скорость потребления кислорода митохондриями и кальциевая активность нейрон-глиальной сети, подтверждающие нейропротективное действие нейротрофического фактора.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:

- **проведено** тестирование биологического эффекта аденоассоциированного вирусного вектора, несущего в своей последовательности ген BDNF;

- **выявлен** нейропротективный эффект нейротрофического фактора BDNF в условиях сниженного содержания кислорода;

- **внедрены** сформулированные в диссертационной работе научные положения, выводы и практические рекомендации легли в разработку новых и модификацию имеющихся общих и специальных курсов для студентов и аспирантов биологических и медицинских специальностей (как в качестве лабораторного практикума, так и лекционных курсов);

- **определены** перспективы использования предложенных подходов по изучению антигипоксического и нейропротективного действия BDNF. Новые данные могут быть использованы на доклиническом этапе исследований новых нейропротективных фармакологических препаратов, влияющих на адаптацию нервной системы к действию гипоксии.

Оценка достоверности результатов исследования выявила:

- для экспериментальных работ использованы современные методы и технические средства для получения и обработки данных, обеспечивающие воспроизводимость результатов исследований, выполненных по предложенным методикам;

- теория работы построена в русле расширения существующей концепции об адаптации нервной системы к действию гипоксии как общего функционального свойства нейронных сетей и согласуется с опубликованными данными по теме диссертации;

- идея базируется на анализе имеющихся в литературе сведений о сущности, механизмах функционирования клеток головного мозга в норме и при воздействии стресс-факторов;

- использованы стандартные для данного направления исследований методы сбора и статистического анализа экспериментальных данных;

- установлено, что результаты работы не противоречат современным представлениям в области нейрофизиологии, согласуются с данными других авторов, дополняют и расширяют их, объем исследования достаточен для получения детальной и объективной информации, необходимой для обоснования выводов и практических рекомендаций;

- использованы современные методы регистрации функционального состояния дыхательной цепи митохондрий, которые проведены с использованием мышей линии C57Bl/6 и CBA. В экспериментах *in vivo* выборка животных составила 115 мышей. Эксперименты *in vitro* выполнены на 136 диссоциированных культурах клеток головного мозга.

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном участии в проведении работы на всех этапах её выполнения, включая подготовку и выполнение экспериментальных исследований, сбор и обработку полученных результатов, их анализ и обсуждение, а также подготовку научных статей и представление результатов на конференциях.

Диссертация является целостным, законченным научным исследованием, охватывает основные вопросы поставленной научной проблемы и соответствует критериям внутреннего единства, что подтверждается четкой логикой и соответствующей содержанию работы структурой исследования, формулировками цели работы и выводов на основании полученных результатов. Диссертация соответствует требованиям пунктов 9–11, 13, 14 «Положения о присуждении ученых степеней»,

утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842.

На заседании 10 октября 2019 г. диссертационный совет принял решение присудить Астрахановой Т.А. ученую степень кандидата биологических наук по специальности 03.03.01 – физиология.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 17 человек, из них 9 докторов наук по специальности 03.03.01 – физиология, участвовавших в заседании, из 22 человек, входящих в состав совета, дополнительно введены на разовую защиту 0 человек, проголосовали: за 16, против 1, недействительных бюллетеней 0.

Председатель

диссертационного совета

Воденеев Владимир Анатольевич

Ученый секретарь

диссертационного совета

Соколова Евгения Александровна

10 октября 2019 г.

