

## ОТЗЫВ

официального оппонента Зеленецкого Николая Вячеславовича, доктора ветеринарных наук, профессора на диссертацию Кириченко Евгении Юрьевны на тему: «Роль щелевых контактов и белков-коннексинов в нейро-глиальных и нейро-глио-васкулярных взаимодействиях в таламокортикальной системе мозга крыс», представленную в диссертационный совет Д 220.062.02 на базе федерального государственного образовательного учреждения высшего образования «Ставропольский государственный аграрный университет» к защите на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 06.02.01 - диагностика болезней и терапия животных, патология, онкология и морфология животных

### 1. Актуальность темы диссертационного исследований

Существование глиа-глиальных и нейро-нейрональных щелевых контактов имеет критическое значение как для развития центральной нервной системы млекопитающих, так и для ее нормального функционирования. Считаю, что анализируемая работа находится на переднем крае молекулярной биологии и нейрологии, так как посвящена изучению щелевых контактов и белков-коннексинов в нейро-глиальных и нейро-глио-васкулярных взаимодействиях в таламокортикальной системе мозга млекопитающих на примере крысы.

В недавнем прошлом для проверки гипотезы о том, что клетки используют каналы для обмена небольшими молекулами, в клетки, растущие в культуре, вводили флуоресцирующие молекулы. С помощью микроскопа наблюдали диффузию этих молекул во времени. Эти эксперименты показали, что молекулы проходят между соседними клетками гораздо быстрее, чем этого можно было бы ожидать, если бы они проходили через липидные слои плазматической мембраны. Результаты подтвердили существование прямых каналов, связывающих цитозоль соседних клеток. В дальнейшем эти каналы были идентифицированы как щелевые контакты. Используя флуоресцирующие молекулы различного размера, было показано, что через щелевой контакт могут проходить молекулы размером до 1200 дальтон (что соответствует диаметру около 2 нм), а молекулы более 2000 дальтон задерживаются.

Щелевые контакты состоят из группы белковых каналов цилиндрической формы, направленных от плазматической мембраны и располагающихся между смежными клетками, в промежутке 2-3 нм. Канал щелевого контакта состоит из двух коннексинов. Каждый из них содержит шесть белковых субъединиц - коннексинов. В настоящее время семейство коннексинов насчитывает более 20 разных коннексиновых генов. Для центральной нервной системы млекопитающих основными являются коннексины 43 и 30, входящие в состав щелевых контактов между глиальными клетками, а также коннексин 36, являющийся субъединицей коннексинов щелевых контактов нейронов.

Проницаемость щелевых контактов контролирует гейтинг, или воротный механизм. Существуют убедительные доказательства в пользу того, что гейтинг

каналов находится под контролем протеинкиназ, которые фосфорилируют субъединицы коннексина, а также контролируется внутриклеточным рН и ионами кальция. При увеличении концентрации ионов кальция проницаемость этих каналов падает, а при высоких концентрациях канал полностью закрывается. Это служит механизмом клеточной самозащиты, поскольку при апоптозе происходит резкое возрастание внутриклеточной концентрации кальция, а закрытие щелевых каналов защищает соседние клетки, не позволяя им случайно включать механизм апоптоза.

В настоящее время обнаружены еще два семейства белков щелевых контактов. Иннексины (коннексины беспозвоночных) найдены только у беспозвоночных и, несмотря на название, не являются гомологами коннексинов. Тем не менее они способны образовывать межклеточные контакты, которые внешне и по своим свойствам напоминают щелевые контакты позвоночных. Паннексины обнаружены у позвоночных и у беспозвоночных и по структуре отличаются от коннексинов и иннексинов. Паннексины почти исключительно находятся в нейронах, что позволяет предполагать, что они могут играть важную роль в развитии и функционировании этих клеток, даже у организмов с примитивной нервной системой. Описанные факты позволяют считать, что щелевые контакты возникли, по меньшей мере, дважды в ходе эволюции животных; это произошло совершенно независимым образом в результате конвергентной эволюции.

В настоящее время щелевые контакты рассматривают в качестве важного элемента развития различных патологических процессов в центральной нервной системе. Белки коннексины являются потенциальными терапевтическими мишенями при лечении ряда нейродегенеративных заболеваний. Активно обсуждают возможную роль коннексинов и щелевых контактов в патогенезе фатальных инфекционных прионных болезней центральной нервной системы: скрепи инфекций у овец и коз, губчатой энцефалопатии крупного рогатого скота, трансмиссивной энцефалопатии норок; паразитарных инфекциях ЦНС позвоночных: токсоплазмозов, шистосомозов, случной болезни непарнокопытных и су-ауру верблюдов, лошадей, ослов, мулов и собак. Следовательно, исследование особенностей строения щелевых контактов, а также их локализации является фундаментальной задачей, решение которой открывает новое научное направление для изучения регуляции развития различных патологий ЦНС, в том числе прионных заболеваний и нейроканцерогенеза с помощью воздействия на щелевые контакты.

В связи с выше сказанным считаю, что диссертационная работа Кириченко Евгении Юрьевны является актуальной и своевременной.

## **2. Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации**

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации обеспечена методологически правильной основой проведенных исследований: тщательным анализом доступных

литературных источников, создавшим теоретические предпосылки изучения структуры и функции щелевых контактов и белков-коннексинов в нейро-нейрональных, нейро-глиальных и нейро-глио-васкулярных взаимодействиях в корковых и подкорковых модулях тактильного анализатора млекопитающих на примере крысы. Соискателем правильно намечена цель и поставлены задачи исследований. Достоверные результаты получены с использованием современных и ультрасовременных методов исследований: гистологических, иммуногистохимических, иммунофлюоресцентных, электронно-микроскопических, иммуноэлектронномикроскопических и морфометрических. Исследования проведены на сертифицированном оборудовании, а полученные морфометрические данные подвергнуты статистической обработке с применением сертифицированного модуля интерактивных измерений, и двух лицензионных программ.

### **3. Достоверность научных положений**

Работа поддержана грантами Российского Фонда Фундаментальных исследований (РФФИ). Достоверность результатов работы, обусловлена достаточным числом экспериментальных животных, детальным изучением литературы по теме исследования, использованием современных морфологических и иммуногистохимических методов исследования на светооптическом и ультраструктурном уровнях. Исследования проведены на сертифицированном оборудовании, доказана их повторяемость.

Результаты исследований доложены на международных конференциях, где получили признание и одобрение ведущих отечественных и зарубежных морфологов. Они опубликованы в 54 научных статьях, в том числе 25 статей – в изданиях, включенных ВАК при Министерстве науки и высшего образования России в перечень, рекомендуемый для публикации основных научных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата и доктора наук, из них 21 – публикации в изданиях, включенных в базы данных Scopus, Web of Science.

Результаты проведенных исследований легли в основу специального курса практических занятий для студентов-магистров. Они используются в учебном процессе ряда вузов России, вошли составной частью в цикл летней школы Brain Facts Summer School (Шанхай, Китай, 2018–2023 гг.).

Работа иллюстрирована тремя таблицами и 47 рисунками: все они высочайшего качества.

Работа оформлена в основном согласно ГОСТу Р 7.0.11-2011 «Диссертация и автореферат диссертации», ГОСТу Р 2.105-2019 «Общие требования к текстовым документам».

### **4. Научная новизна и ценность полученных результатов**

В результате проведенных уникальных исследований с применением современных и ультрасовременных методов впервые дана подробная

ультраструктурная характеристика щелевых контактов, образующих панглиальные сети; получены оригинальные данные о распределении белков щелевых контактов в нейронах и в глиии корковых и подкорковых зон представительства вибрисс, впервые получены данные о наличии элементарных ансамблей тормозных нейронов, продемонстрирована гетерогенность астроцитов по экспрессии белков щелевых контактов коннексина 30 и коннексина 43 в коре и таламусе. Автором разработаны: оригинальная методика изготовления серийных ультратонких срезов для изучения ультраструктуры нервных и глиальных клеток, а также внутриклеточных структур в совокупности; собственные протоколы исследования коннексинов и щелевых контактов методами иммунофлюоресцентной сверхконтрастной (конфокальной) микроскопии и электронной иммуногистохимии. Полученные данные являются основополагающими базовыми для проведения дальнейших исследований нервной системы и создания искусственного интеллекта.

#### **5. Значимость для науки и практики полученных соискателем результатов**

На основании полученных результатов соискателем Кириченко Евгенией Юрьевной сформулирована гипотеза о роли щелевых контактов в обеспечении локальной и дистантной синхронизации ритмической активности при таламокортикальном и синаптическом проведении, для обеспечения тканевого и клеточного гомеостаза в корковых и подкорковых клеточных ансамблях.

Данные об ультраструктурных характеристиках щелевых контактов, а также составляющих их различных типах коннексинов и коннексонов в составе нейро-глио-васкулярных комплексов поднимают на новый уровень знания об структуре и механизмах регуляции функционирования гематоэнцефалического барьера.

Уникальные результаты о распределении щелевых контактов и коннексинов имеют прикладное значение в рамках терапии дегенеративных заболеваний ЦНС, в том числе прионных болезней животных. Проведенное исследование является стартовым для разработки алгоритмов механизмов блокировки коннексинов щелевых контактов в нанотрубочках при развитии ряда нейродегенеративных болезней, а также разработке различных терапевтических стратегий по управлению коннексинами и щелевыми контактами в опухолях для повышения эффективности терапии. Кроме того, полученные сведения о гетерогенности астроглии по экспрессии коннексинов привносят значительный вклад в концепцию о биологии глиальных опухолей центральной нервной системы.

#### **6. Личный вклад соискателя в разработку научной проблемы**

Диссертация является результатом исследований автора в период с 2005 по 2020 годы. Соискатель Кириченко Евгения Юрьевна самостоятельно поставила цель и определила задачи исследования, разработала план по изучению роли

целевых контактов и белков-коннексинов в нейро-глиальных и нейро-глио-васкулярных взаимодействиях в таламокортикальной системе мозга млекопитающих на примере крысы. Лично диссертантом выполнены все исследования, проведённые в лицензированных лабораториях, осуществлен обзор литературы, написаны статьи, сделаны презентации к докладам, оформлена диссертация и составлен автореферат. Также лично диссертантом проведён анализ и обобщение всего фактического материала, сделаны выводы и оформлены практические предложения и научные рекомендации. Доля личного участия соискателя при выполнении диссертации составляет 95%.

## **7. Содержание диссертации, её завершенность, подтверждение публикаций автора**

Диссертационная работа оформлена по общепринятому плану и соответствует установленным требованиям. Диссертация изложена на 210 страницах машинописного текста. Она содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, собственные исследования, включающие материалы и методы исследований, полученные результаты и обсуждение (включают 11 разделов), заключение, список литературы, принятые сокращения. Список литературы включает 338 источников, из них только 25 отечественных авторов. Работа иллюстрирована тремя таблицами и 47 рисунками.

Диссертация Кириченко Е.Ю. является законченным научным трудом, полностью выполнившим намеченные задачи и достигнувшем поставленной цели научных изысканий. Работа написана грамотно, материал изложен логично, последовательно и ясно. В собственных исследованиях соискатель представила результаты комплексного изучения характера нейральных и глиальных антигенов в колонках соматосенсорной коры, вентральных и ретикулярных ядрах таламуса, закономерности распределения коннексинов в соматической коре и ядрах зрительных бугров, ультраструктуры неро-нейрональных и глия-глиальных щелевых контактов в колонках соматической коры и ядрах таламуса млекопитающих на примере крысы.

Результаты исследований по теме диссертации опубликованы автором в 54 работах в сборниках международных и национальных конференций, симпозиума, центральных журналах и отдельных изданиях. В статьях в изданиях, рекомендованных ВАК при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации для публикации основных результатов диссертационной работы на соискание учёной степени кандидата и доктора наук - 25. В статьях в изданиях, индексируемых в международных базах цитирования Scopus и Web of Science - 21.

## **8. Соответствие содержания автореферата основным положениям диссертации**

Автореферат изложен на 45 страницах, включает в себе общую характеристику диссертационной работы, основное содержание работы, заключение, включающее выводы, рекомендации производству и перспективы дальнейшей разработки темы, а также список работ автора по материалам диссертации. Автореферат соответствует основным положениям диссертации.

## 9. Замечания и вопросы по диссертации

### *Замечания:*

1. По тексту диссертации имеются единичные грамматические ошибки, неправильная расстановка знаков препинания, неудачные выражения (с. 77, 80, 85, 93, 107, 163 и т. д.)
2. При оформлении диссертации и автореферата допущены незначительные нарушения системы стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу: нумерация страниц диссертации осуществляется сверху, а в автореферате – снизу страницы; размещение авторского рисунка в разделе «Литературный обзор» (рисунок 4, с. 37) вызывает удивление; каждая глава должна начинаться с новой страницы.
3. В диссертации должна быть сквозная нумерация рисунков: не допускается наличие рисунков 7 Б, В, 16 А, В, Г, Д, Е, Ж, З и т. д.
4. В разделе 2.1 «Материал и методы исследований» не указан возраст исследованных животных.
5. В оглавлении диссертации отсутствуют ссылки на разделы «Практические предложения» и «Рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы», в то время как в диссертации и в автореферате указанные разделы имеются.

### *Вопросы:*

1. В главе «Список литературы» представлены 25 отечественных из общего числа 338. Чем соискатель может объяснить такую разницу в числе отечественных и иностранных источников?
2. Какие изменения нейро-нейрональных и нейро-глио-васкулярных щелевых контактов происходят с возрастом млекопитающего?
3. Вы утверждаете, что астроциты, объединенные посредством щелевых контактов в единую сеть, выступают в качестве основного посредника между нейронами и сосудистым руслом, образуя в комплексе нейро-глио-сосудистые ансамбли. В связи с этим, что же такое гемато-энцефалический барьер в свете вашего исследования?
4. Вы утверждаете, что в коре и таламусе количество глио-глиальных щелевых контактов значительно преобладает над нейрональными. Почему? Что вы можете сказать о их численном соотношении в связи с возрастом животного и при патологиях ЦНС?
5. Как вы полагаете, с чем связана неоднородность строения четвертого слоя баррельной коры и таламических ядер, почему эти структуры имеют особую клеточную и синаптическую организацию с неоднородным распределением химических синапсов, астроглиальных элементов, миелинизированных и немиелинизированных отростков?

## 10. Заключение о соответствии диссертации требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения учёных степеней» ВАК при Министерстве науки и высшего образования России

Диссертационная работа Кириченко Евгении Юрьевны на тему «Роль щелевых контактов и белков-коннексинов в нейро-глиальных и нейро-глио-

васкулярных взаимодействиях в таламокортикальной системе мозга крыс» является завершённой научно-квалификационной работой, выполненной на высоком методическом уровне с использованием традиционных, современных и ультрасовременных методов исследования. В диссертации на основании проведённых соискателем исследований представлено решение научной проблемы о роли щелевых контактов и белков-коннексинов в нейронейрональных, нейро-глиальных и нейро-глио-васкулярных взаимодействиях в таламокортикальной системе мозга млекопитающих на примере крысы. Решение этой проблемы расценивается как научное достижение в области морфологии и функционирования центральной нервной системы млекопитающих. Оппонируемая диссертационная работа соответствует требованиям пункта 9 «Положения о порядке присуждения учёных степеней» ВАК при Министерстве науки и высшего образования России, предъявляемым к докторским диссертациям, а её автор **Кириченко Евгения Юрьевна** заслуживает присуждения учёной степени доктора биологических наук по специальности 06.02.01 - диагностика болезней и терапия животных, патология, онкология и морфология животных.

Официальный оппонент доктор  
ветеринарных наук, профессор, профессор  
кафедры анатомии животных  
Федерального государственного  
бюджетного образовательного  
учреждения высшего образования «Санкт-  
Петербургский государственный  
университет ветеринарной медицины»



Зеленевский Николай Вячеславович

06.04.2021 г.

196084, Санкт-Петербург,  
ул. Черниговская, д. 5,  
ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский  
государственный университет ветеринарной  
медицины (СПбГУВМ)». Тел. (812) 388-36-31.  
8(911) 955-44-54 E-mail: [zmvprof@mail.ru](mailto:zmvprof@mail.ru)

ПОДПИСЬ РУКИ  
*Зеленевский Н.В.*  
УДОСТОВЕРЯЕТСЯ  
06 04 2021  
Нач. канцелярии

