

## **ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА**

на диссертационную работу Моисеева Константина Юрьевича «Возрастные изменения NO-опосредованной синаптической передачи в симпатической нервной системе крыс», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности  
03.03.01 – физиология

### **Актуальность исследования**

Автономная (вегетативная) нервная система играет ведущую роль в поддержании постоянства внутренней среды организма в процессе приспособления его органов и тканей к изменяющимся условиям жизнедеятельности. Поэтому выяснение особенностей её строения и функционирования издавна являлось одной из важнейших задач физиологии и медицины. Однако, несмотря на почти трехсотлетнюю историю исследований, в этой области остается целый ряд нерешенных проблем. В частности, до сих пор неясными являются многие аспекты структурно-функциональной организации ганглиев в разных отделах автономной нервной системы и специфические процессы, обеспечивающие их формирование в пре- и постнатальном онтогенезе. Изучение этих вопросов значимо не только для фундаментальной науки, но также представляет интерес для практической медицины. Посредством выяснения ключевых для нормального созревания и функционирования автономных ганглиев факторов и механизмов, такие исследования проливают свет на причины развития столь серьезных вегетативных патологий и расстройств как синдром Горнера, болезни Рейно и Гиршпрунга, а также синдром вегетативной дисфункции, способствуя тем самым разработке более эффективных методов их коррекции.

Согласно полученным в последние десятилетия данным одним из важнейших медиаторов и модуляторов на разных уровнях автономной нервной системы является оксид азота (NO). Установлено, что посредством сложного сочетания разнонаправленных влияний на нейрональную возбудимость, синаптическую проводимость и пластичность в периферических и центральных структурах, NO непосредственно участвует в автономном контроле висцеральных систем, в частности, сердечно-сосудистой. Показано, что некоторые заболевания этой системы ассоциированы с нарушением или ослаблением эффектов оксида азота в разных локусах, приводящим к дисфункции симпатических и парасимпатических механизмов регуляции. Однако исчерпывающее и ясное представление о роли NO в автономной регуляции работы сердца и сосудов даже в нормальных физиологических условиях на данный момент трудно

сформировать из-за большого количества противоречивых данных и остающихся без ответа вопросов. При этом одной из требующих специального изучения проблем является вклад NO-зависимых механизмов в модуляцию проведения возбуждения в автономных ганглиях, контролирующей сердечно-сосудистую систему, а также связанные с возрастом перестройки в реализации таких механизмов. На основании всего, указанного выше, диссертационное исследование К.Ю. Моисеева, посвященное структурно-функциональной организации NO-опосредованной нейротрансмиссии в симпатическом шейном ганглии на разных этапах постнатального онтогенеза, является актуальным как с научной, так и прикладной точек зрения.

### **Научная новизна исследования**

В результате выполнения работы автором получен комплекс новых, разноплановых данных. Впервые продемонстрировано усиление и усложнение фоновой и вызванной электростимуляцией шейного симпатического нерва активностей постганглионарных волокон краниального шейного узла в процессе постнатального развития и выявлена их нечувствительность к действию нитрергических соединений вплоть до 20 суток жизни. Впервые установлено активирующее действие оксида азота на нейротрансмиссию в исследуемом симпатическом ганглии, которое опосредуется гуанилатциклазной системой и проявляется в увеличении амплитуды и частоты фоновых, а также прогрессирующем с возрастом усилении вызванных разрядов в волокнах внутреннего сонного нерва при действии донора NO нитропрусида натрия или мембранопроникающего аналога цГМФ (8Br-цГМФ) и, напротив, уменьшения указанных видов импульсации под влиянием блокатора синтеза NO L-NAME или специфического ингибитора растворимой гуанилатциклазы (ODQ).

В работе впервые получены данные о разной степени солокализации нейрональной NO синтазы с холинацетилтрансферазой, кальбиндином, кальретенином и кокаин- и амфетамин-регулируемым транскриптом (CART) в преганглионарных симпатических нейронах в спинном мозге и преганглионарных волокнах краниального шейного симпатического узла на разных этапах постнатального развития. Впервые показано, что в течение первого месяца жизни происходит уменьшение количества и NO-синтезирующей активности нитрергических преганглионарных симпатических нейронов с уменьшением среди них доли холинергических и кальбиндин-экспрессирующих клеток, но увеличением числа кальретенин- и CART-содержащих. В свою очередь впервые показано, что количество NO-

продуцирующих преганглионарных волокон в краниальном симпатическом узле возрастает начиная с 10 суток после рождения и сопровождается усилением экспрессии в них нейрональной NO синтазы и ее солокализации с холинацетилтрансферазой и кальретином.

### **Достоверность и обоснованность результатов исследования**

Достоверность представленных результатов не вызывает сомнений, поскольку она обеспечена современными научным и методологическим уровнями работы, применением комплекса общепринятых и адекватных экспериментальных методов, достаточным количеством проанализированного фактического материала. Полученные в работе данные соответствуют цели и задачам исследования, подвергнуты корректной статистической обработке. Результаты работы интерпретированы на основании последних достижений в соответствующей области.

Положения, выносимые на защиту, достаточно аргументированы и подкреплены конкретными фактами, полученными в ходе выполнения отдельных фрагментов исследования. Выводы соответствуют поставленным в работе задачам, обоснованно вытекают из полученных экспериментальных данных и согласуются с положениями, выносимыми на защиту.

Материалы диссертационной работы в необходимом объеме отражены в 14 печатных работах, включающих 4 статьи в ведущих рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК РФ и индексируемых в международных база данных Web of Science или Scopus. Материалы исследования были неоднократно представлены для обсуждения на научных конференциях, съездах и конгрессах всероссийского или международного уровня.

### **Практическая и теоретическая значимость работы**

Теоретическое значение работы состоит в расширении имеющихся на сегодняшний день знаний о нейрохимической организации и функциональных свойствах преганглионарных и постганглионарных структур симпатической нервной системы, а также перестройках в них в процессе постнатального развития. Помимо этого, установленное автором участие NO-зависимых механизмов в модуляции нейротрансмиссии на уровне краниального шейного ганглия с выявлением возрастных особенностей в реализации этого процесса вносят существенный вклад в формирование более четких представлений о роли оксида азота в автономной регуляции сердечно-сосудистой системы на разных этапах постнатального онтогенеза. В практическом аспекте результаты диссертационного исследования могут

способствовать лучшему пониманию патогенеза ряда висцеральных патологий, обусловленных нарушениями в работе автономной нервной системы (синдром Горнера, болезни Рейно и Гиршпрунга, синдром вегетативной дисфункции) и быть полезными при разработке более эффективных методов их коррекции, в том числе с использованием нитреергических соединений. Материалы работы также могут быть применены соответствующими специалистами в их научно-исследовательской деятельности и быть использованы в курсах преподавания общей физиологии, физиологии висцеральных систем, анатомии и гистологии.

### **Объем и структура работы**

Материалы диссертационной работы изложены на 126 страницах печатного текста, проиллюстрированы 18 таблицами и 30 рисунками. Диссертация построена традиционно, оформлена в соответствии с требованиями ГОСТ и содержит все необходимые разделы: «Список сокращений», «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы исследования», «Результаты собственных исследований», «Обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Список литературы». Последний содержит 228 источников (40 отечественных и 188 зарубежных).

### **Общая характеристика работы**

Во *введении* автор, кратко характеризуя известные к настоящему времени сведения по теме исследования, обосновывает актуальность решаемой в работе проблемы и степень ее разработанности, определяет цель исследования и необходимые для ее достижения задачи, характеризует научную новизну исследования, формулирует положения, выносимые на защиту, определяет теоретическую и практическую значимость полученных результатов. Раздел также содержит необходимую информацию о методологии и методах исследования, степени достоверности полученных данных, об апробации работы на научных форумах и в публикациях, а также о личном вкладе в нее автора.

*Обзор литературы* соответствует теме диссертации, отражает современный уровень знаний по вопросам, исследуемым в работе. Анализируя отечественные и зарубежные литературные источники разных лет, включая опубликованные в последние два года, автор суммирует имеющиеся сведения о морфологических особенностях преганглионарных нейронов симпатических ядер спинного мозга и организации их связей с краниальным шейным ганглием. В специальных разделах приводятся данные

о характеристиках фоновой и вызванной импульсной активности в пре- и постганглионарных симпатических волокнах. При этом особое внимание в обзоре уделено фактам, свидетельствующим о перестройках в структурной, нейрохимической организации и электрической активности рассматриваемых симпатических структур в процессах эмбрионального и постнатального развития. В заключительной части обзора автор обобщает опубликованные на сегодняшний день сведения о роли и молекулярных механизмах участия оксида азота в модуляции нейротрансмиссии в центральной и периферической нервной системе. В целом, литературный обзор отражает хорошую ориентированность автора в сфере его научных интересов и дает достаточное представление о современном состоянии проблемы, решаемой в диссертации. В качестве недостатка следует отметить отсутствие в обзоре заключительных замечаний, акцентирующих внимание на малоизученных вопросах в рассматриваемой области и подводящих читателя к целям и задачам работы.

Во второй главе диссертации дается описание *материалов и методов*, использованных в работе. Здесь достойным внимания является то, что исследование выполнено на 7 группах крыс разного возраста с использованием комплекса современных электрофизиологических, фармакологических, иммуногистохимических методов, а также вестерн-блоттинга. Такой подход требовал от автора уверенного владения всеми указанными методами, очень разными и трудоемкими, и определил разноплановость и качественно новый уровень полученных результатов. В разделе достаточно подробно изложены протоколы иммуногистохимических исследований и вестерн-блоттинга, однако в описании дизайна электрофизиологических экспериментов, особенно с фармакологическими субстанциями, отсутствует ряд важных деталей. Также отсутствуют сведения о группе крыс возрастом 1 год, которая использовалась в электрофизиологических исследованиях.

В третьей главе изложены *результаты* проведенных исследований. Последовательно изложены полученные автором данные о связанных с разными этапами постнатального онтогенеза перестройках в фоновой и вызванной электростимуляцией шейного симпатического нерва электрических активностях постганглионарных волокон краниального шейного узла и возрастных особенностях действия на эти виды импульсации нитрергических соединений и модуляторов гуанилатциклазной системы. В отдельных подразделах представлены данные иммуногистохимических исследований и вестерн-блоттинга, характеризующие изменения в экспрессии нейрональной NO синтазы в преганглионарных симпатических

нейронах в спинном мозге и преганглионарных волокнах краниального шейного симпатического узла и ее солокализации с холинацетилтрансферазой, кальбиндином, кальретинином и CART на разных этапах постнатального развития. Эта глава подробно иллюстрирована таблицами и рисунками, облегчающими восприятие представленного в главе экспериментального материала. Общая последовательность изложения соответствует логике исследования. В качестве недостатка в оформлении следует отметить не всегда удобное для чтения размещение в тексте таблиц и рисунков.

В четвертой главе автором проведено *обсуждение* полученных в работе результатов и их интерпретация с привлечением имеющихся в литературе сведений по отдельным аспектам исследования.

В главе «*Заключение*» автор, обобщая данные диссертационного исследования, формулирует новое представление о двоякой роли оксида азота в процессах структурно-функционального созревания симпатических преганглионарных нейронов, иннервирующих краниальный шейный ганглий, на разных этапах постнатального онтогенеза.

Диссертация завершается 5 выводами и списком литературы, который хорошо выверен и соответствует требованиям ГОСТ.

Работа в целом производит хорошее впечатление. Она написана правильным, понятным, лаконичным научным языком, читается с интересом и представляет собой единое целое, отдельные части которого логично связаны между собой. Все заимствованные сведения сопровождаются корректными ссылками на источники.

**Автореферат** диссертации соответствует требованиям ВАК РФ, изложен на 23 страницах, соответствует содержанию работы, отражает ее основные результаты, положения и выводы. В текстах диссертации и автореферата встречаются опечатки и неудачные выражения, однако они не портят в целом *положительное* впечатление от работы.

### **Замечания и вопросы по диссертации**

Наряду с отмеченными выше достоинствами диссертации, в ней имеются некоторые недостатки. Кроме того, при ознакомлении с работой возникло несколько вопросов.

Замечания:

1. В Таблице 4 (стр. 53 диссертации) различия показателей фоновых разрядов симпатических волокон у разных возрастных групп указаны по сравнению с группой новорожденных, однако данные для

последней не представлены.

2. Для демонстрации вовлечения гуанилатциклазной системы в эффекты оксида азота на импульсную активность симпатических волокон большей убедительностью обладали бы эксперименты с аппликацией донора NO на фоне действия ингибитора гуанилатциклазы.
3. Задачи и результаты работы шире, чем подразумевает её название, поскольку раскрывают не только возрастные особенности NO-зависимой модуляции нейротрансмиссии, но и процессы структурного созревания нитрергической иннервации симпатического ганглия в процессе постнатального онтогенеза. Но это замечание не столько указывает на недостаток, сколько свидетельствует в пользу большей результативности исследования.

Вопросы:

1. Как Вы изучали действие нитрергических соединений и модуляторов гуанилатциклазной системы в электрофизиологических экспериментах? Разные дозы тестировались на одном препарате ганглия или на разных? Действие одной дозы на одном препарате оценивали однократно или многократно, в одной временной точке или в нескольких?
2. На представленных в диссертации рисунках 10 (стр. 64) и 13 (стр. 67) прослеживаются различия в действии изученных фармакологических препаратов на разные фазы вызванного ответа внутреннего сонного нерва у крыс разного возраста. Являлось ли это закономерностью и можно ли на этом основании сделать какие-либо выводы о возрастных особенностях модуляции нейротрансмиссии в различных преганглионарных волокнах, которые подвергались электростимуляции?
3. Чем можно объяснить выявленное Вами в раннем постнатальном онтогенезе уменьшение количества преганглионарных NO-синтезирующих нейронов в спинном мозге с параллельным увеличением количества нитрергических преганглионарных волокон? Может ли это быть связано с транслокацией процессов экспрессии NO из сомы преганглионарного нейрона в его терминаль или с гибелью спинальных нитрергических клеток и появлением NO-синтезирующей активности у преганглионарных симпатических волокон *de novo*?

Высказанные замечания и вопросы не являются принципиальными и не умаляют достоинств диссертационной работы.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Моисеева Константина Юрьевича «Возрастные изменения NO-опосредованной синаптической передачи в симпатической нервной системе крыс», выполненная под руководством профессора, д.м.н. Маслокова Петра Михайловича, является законченной научно-квалификационной работой, содержащей решение актуальной научной задачи – определение роли NO-зависимых механизмов в процессах структурно-функционального созревания пре- и постганглионарных образований симпатической нервной системы, обеспечивающих сердечно-сосудистую регуляцию, на разных этапах постнатального онтогенеза.

По методическому уровню, новизне и научно-практической значимости полученных результатов, обоснованности научных положений и выводов диссертация соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842, с изменениями от 01.10.2018 г. № 1168, предъявляемым к диссертационным работам на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, а ее автор Моисеев Константин Юрьевич заслуживает присуждения искомой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.03.01 – физиология.

### Официальный оппонент

доктор биологических наук,  
заведующий лабораторией кортико-висцеральной физиологии  
ФГБУН Институт физиологии им. И.П.Павлова Российской академии наук  
Любашина Ольга Анатольевна

Почтовый адрес: 199034, г. Санкт-Петербург, наб. Макарова, д. 6

Тел.: 8 (813) 70 72-501

E-mail: lyubashinaoa@infran.ru

Наименование организации: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук

Тел.: 8 (812) 328-07-01, 8 (812) 328-13-01

E-mail: Pavlov.institute@infran.ru

Должность в организации: заведующий лабораторией

«    » января 2021 г.

Подпись руки *Любашина О.А.* удостоверяю  
ст. инспектор *Маслоков П.М.*  
«28» 01 2021 г.

