

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу Белозор Ольги Сергеевны «Роль астроглии в патогенезе спиноцеребеллярной атаксии первого типа», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 3.3.3. Патологическая физиология

Актуальность исследования

Нейродегенеративные заболевания являются в настоящее время одной из острейших медицинских и социальных проблем. В отличие от многих других нейродегенеративных заболеваний, имеющих возраст-зависимый характер, спиноцеребеллярная атаксия первого типа развивается в молодом возрасте. Таким образом, страдает работоспособное население, увеличивается число инвалидов, возрастают расходы на длительную терапию и реабилитацию больных. В настоящее время существует только симптоматическое лечение больных СЦА1, что обуславливает необходимость поиска возможных клеток-мишеней для разработки новых терапевтических подходов.

Недавние исследования моделей нейродегенеративных заболеваний на животных показывают, что в развитии многих нейродегенеративных расстройств вовлекаются патологические изменения глиальных клеток, влияющие на нейроны. В частности, при СЦА1, наряду с включением нейрональных путей, наблюдаются реактивные изменения глии Бергмана (ГБ). В случае СЦА 1 влияния глиальных изменений на патогенез остаются малоизученными. Причиной этого досадного факта, в первую очередь, является сложность разделения вклада астроцитов и вклада других факторов, приводящих к нейродегенерации, в существующих моделях СЦА1 на животных.

Для разработки эффективной терапии необходимо расширить представления о патогенезе СЦА1, в частности, о роли астроцитов в развитии нейродегенерации, чему и посвящена диссертация Белозор О.С.

Степень обоснованности научных положений и выводов, сформулированных в диссертации

Сформулированные задачи соответствуют цели исследования, для их решения использовались современные методы исследований. Положения, выносимые на защиту, основаны на результатах, полученных в ходе исследования, и представляются в достаточной мере аргументированными. Выводы диссертации соответствуют заявленным

цели и задачам, логично вытекают из полученных экспериментальных данных и согласуются с положениями, выносимыми на защиту.

Материалы диссертационного исследования в необходимом объёме представлены в публикациях в профильных журналах, в том числе в журналах, рекомендованных ВАК для опубликования результатов диссертаций на соискание учёных степеней, и приравненных к ним изданиях. Результаты были обсуждены на конференциях всероссийского и международного уровня и опубликованы в сборниках докладов.

Автореферат диссертации содержит все необходимые разделы и в полной мере отражает содержание диссертации, оформлен в соответствии с существующими требованиями.

Достоверность и научная новизна

Достоверность полученных результатов подтверждается достаточным объёмом экспериментального материала, полученным различными методами. Для обработки полученных данных были применены современные методы статистического анализа. Статистическая обработка результатов выполнена с учетом характера распределения полученных данных, для решения конкретных задач в каждом эксперименте применяли необходимый тип анализа.

Автором разработаны модели реактивности астроцитов с использованием методов оптогенетики (модель с хронической фотоактивацией ГБ, экспрессирующей ChR2, и модель с экспрессией мутантного атаксина 1 в астроцитах).

Использование этих моделей позволило диссертанту изучить влияние реактивных астроцитов на клетки Пуркинье мозжечка (КП). Выявлено негативное влияние реактивности ГБ на морфологию КП в виде снижения количества КП и уменьшения толщины молекулярного слоя.

Доказано влияние реактивности астроцитов на синаптическую передачу в мозжечке. Выявлено нарушение обратного захвата нейромедиаторов из синаптической щели, приводящее к удлинению времени восстановления ПВ ВПСТ и нарушению кратковременной и долговременной синаптической пластичности.

Полученные результаты демонстрируют, что реактивность астроцитов является объединяющим признаком различных нейродегенеративных заболеваний мозжечка.

Данная работа имеет значение как для фундаментальной науки в области исследования роли астроглии, так и понимания механизмов нейродегенерации. Данные о молекулярных мишенях, вовлечённых в изучаемые процессы, можно использовать при разработке терапевтического подхода к лечению СЦА1 и других нейродегенеративных

заболеваний мозжечка. Созданные модели реактивности астроцитов позволят исследовать механизмы патологических процессов на начальных этапах нейродегенерации мозжечка.

Общая оценка диссертации / замечания и вопросы по диссертации

Диссертация построена по традиционному плану, состоит из введения, обзора литературы, описанных материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов. Материал диссертации изложен на 128 страницах машинописного текста, иллюстрирован 36 рисунками и 6 таблицами. Список цитируемой литературы включает 190 источников, в том числе 8 отечественных и 182 зарубежных.

Несмотря на исключительно высокий уровень исследования, после прочтения диссертационной работы у меня возник ряд несущественных замечаний и вопросов, которые ни в коей мере не умаляют, а наоборот подчеркивают высокий научный уровень данных. Во-первых, у меня возникли замечания к используемой в работе терминологии. В частности, Ольга Сергеевна используют термины «астроглиоз» и «активированные астроциты». Два года назад были опубликованы рекомендации ведущих ученых в данной области, в соответствии с которыми необходимо использовать термин «реактивность астроцитов» (см. Escartin et al, Nat. Neurosci. 2021). Также диссертант называет парную фасилитацию (PPF) усилением парных импульсов. Импульсы (стимулы) как раз даются одинаковой амплитуды. Для названия долговременной синаптической депрессии (LTD) используются 3 разных названия, которые все не вполне точны: синаптическая долговременная депрессия, длительное синаптическое подавление, долговременное ослабление импульса.

Также диссертант обсуждает роль изменений в астроцитах только с точки зрения прямого эффекта на нейроны. Между тем, астроциты играют важную роль в активной среде головного мозга взаимодействуя не только с нейронами, но и другими клетками мозга - микроглией, клетками сосудов, олигодендроцитами, внеклеточным пространством и матриксом (Semyanov&Verkhatski, TINS 2021). Астроцитарная патология оказывает влияние на все эти взаимодействия, что в итоге может привести опосредованному воздействию на нейроны.

В работе не было показано, что оптогенетическая стимуляция ГБ приводит к какому-то ответу этих клеток, например, превышению кальция. В связи с этим, в представленной работе было бы корректно говорить не о хронической активации ГБ, а о хронической стимуляции.

Морфологический анализ проводился при покраске ГБ на GFAP. Покраска на GFAP не отражает реальную морфологию астроцитов. Она показывает только

распределение соответствующих филаментов. При этом дистальные отростки и астроцитарные листочки, которые не содержат GFAP могут атрофироваться.

Ольга Сергеевна пишет, что «высокая степень достоверности полученных результатов подтверждается тем, что научные положения и выводы обоснованы и получены с использованием системного подхода к решению поставленных задач.» Могла бы диссертант прокомментировать, как бессистемный подход к решению задач при корректном проведении экспериментов может дать недостоверные результаты?

Ольга Сергеевна утверждает, что «астроциты регулируют синапсы путем прямого контакта...». Мне ранее не приходилось слышать о прямом контакте. Как этот контакт осуществляется и как регулирует синапс?

Ольга Сергеевна пишет, что щелевыми соединения «позволяют питательным веществам, ионам или нейромедиаторам диффундировать между сетями астроцитов». Это требует пояснения. Почему нейромедиаторы диффундируют по щелевым контактам, а не инактивируются/метаболизируются сразу после захвата? О каких сетях астроцитов идет речь? Как отличить одну сеть астроцитов от другой?

Ольга Сергеевна пишет, что «глутамат является основным возбуждающим нейромедиатором в большинстве областей ЦНС». В каких областях ЦНС глутамат не является возбуждающим нейромедиатором? В продолжение диссертант пишет про «возбуждающую или ингибирующую трансдукцию сигнала» опосредованную глутаматом. Как я понял, под ингибирующей трансдукцией как раз и подразумевалось тормозное действие глутамата. Как оно осуществляется?

Может ли Ольга Сергеевна пояснить, что значит чрезмерная активация астроцитов? Что такое не чрезмерная активация астроцитов?

Диссертант называет раствор, содержащий 234 мМ сахарозы раствором Рингера. При этом сам автор раствора использовал в качестве основы хлорид натрия. Возможно, речь идет о модифицированном растворе Рингера?

Зачем во внеклеточный раствор добавлялось 0,1 мМ пикротоксина, блокатора канала ГАМКА рецепторов? Данный раствор является эпилептогенным и используются для создания модели эпилептогенеза на срезах. Возможно, диссертант исследовала изменения в астроцитах на фоне эпилептогенеза при СЦА1? Тогда это было необходимо отразить в названии работы. Эпилептогенез сам по себе оказывает мощное воздействие на астроциты.

С какой целью во внутриклеточный раствор добавлялось 5 мМ сахарозы?

Есть некоторая путаница со статистическим разделом, которая затрудняет дальнейшую интерпретацию результатов. В частности, Ольга Сергеевна пишет

«Результаты представлены в виде $M \pm SD$, где M – среднее значение, SD – стандартная ошибка среднего». SD - standard deviation или стандартное отклонение. Стандартная ошибка среднего сокращается как SEM - standard error of mean. Предположим, что использовалась стандартная ошибка среднего. Тогда у меня возникает вопрос к достоверности некоторых данных. Например, диапазоны ошибок среднего перекрываются по снижению отношения PPF с $1,9 \pm 0,2$ до $1,76 \pm 0,1$ ($n = 10$ клеток от 3 мышей, $p=0,049$, рисунок 23). Как могло получиться такое значение p ? В целом многие отличия по PPF получились минимальными, хотя и статистически достоверными. Какой физиологический смысл несет значительное понижение PPF на 2,5% при разбросе в 1,1% представленное на рисунке 24Г?

На рисунке 13 репрезентативные кривые, показывающие ПВ ВПСТ на разных панелях, противоречат друг другу. Вообще сравнивать амплитуды вызванных ВПСТ без нормировки не всегда возможно, так как они зависят от качества индивидуального среза, расположения стимулирующего электрода, состояния стимулирующего электрода. Все эти параметры не могут быть точно проконтролированы от эксперимента к эксперименту.

Таблица 6 показывает, что емкость мембраны КП уменьшилась в 2 раза. Это значит, что уменьшилась в 2 раза поверхность мембраны. Если плотность каналов не изменилась, то входное сопротивление тоже должно было уменьшиться в 2 раза. Почему оно не уменьшилось? Как диссертант может это объяснить? Увеличение плотности каналов в два раза должно сказаться на синаптических токах за счет изменения шунтирования и константы времени. Могло ли это оказать влияние на измерения?

Ольга Сергеевна пишет «Низкие концентрации уабаина не влияли на скорость возбуждения КП.» Что такое скорость возбуждения и как она измерялась?

Диссертант пишет о изменении экспрессии EAAT1 на основании иммуноцитохимического анализа, который говорит о клеточном и субклеточном распределении белка. Для количественной оценки уровня экспрессии рекомендуется использовать Western blot в дополнение к иммуноцитохимическому анализу.

Ольга Сергеевна пишет, что «астроциты составляют около половины всех клеток мозга». Это не точная оценка. Астроцитов в мозге немногим больше, чем нейронов. Но в мозге есть микроглия, клетки прекурсоры олигодендроцитов, олигодендроциты.

В разделе выводы нет необходимости повторять статистические данные, представленные в разделе результатов.

Эти вопросы и комментарии в большей своей части касаются терминологии и не затрагивают сути работы.

Заключение

Диссертационная работа Белозор Ольги Сергеевны «Роль астроглии в патогенезе спиноцереbellлярной атаксии первого типа», является законченной научно-квалификационной работой. По актуальности темы, новизне полученных данных и их научно-практической значимости диссертационная работа полностью соответствует требованиям пунктов 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней» (в редакции постановлений Правительства Российской Федерации от 21.04.2016 №335, от 02.08.2016 №748, от 29.05.2017 №650, от 28.08.2017 №1024, от 01.10.2018 №1168, от 20.03.2021 №426), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а её автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 3.3.3. Патологическая физиология.

Официальный оппонент

Доктор биологических наук,
член-корреспондент РАН,
Заместитель директора по научной работе
Государственного Научного Центра
Федерального государственного бюджетного
учреждения науки Институт биоорганической
химии им. академиков М.М. Шемякина
и Ю.А. Овчинникова РАН

14.01.2023

Семьянов Алексей Васильевич

Государственный Научный Центр Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

117997, Российская Федерация, Москва, ГСП-7, улица Миклухо-Маклая, дом 16/10, +7 (495) 335-01-00, office@ibch.ru, <https://www.ibch.ru/>

Подпись д.б.н. Семьянова А.В. заверяю

В.А. Олейников ДФМН

УЧЕНЫЙ СЕКРЕТАРЬ
ИБХ РАН

