

## **ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОПОНЕНТА**

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**

Диссертационная работа Белозор О.С. посвящена исследованию роли астроцитов в развитии нейродегенерации при спиноцеребеллярной атаксии первого типа (СЦА1). Тема работы является актуальной, так как количество людей с нейродегенеративными заболеваниями постоянно увеличивается. В то же время механизмы патогенеза многих нейродегенеративных заболеваний до сих пор остаются неясными. Интерес исследователей к проблеме негативного воздействия астроцитов на нейроны нашел отражение в большом числе научных работ, однако исследования по изучению роли астроглии в патогенезе СЦА1 имеют ряд ограничений. В частности, исследования проводились на моделях мышей либо с повсеместной экспрессией мутантного белка, либо его экспрессией только в нейронах мозжечка, что затрудняет выделение роли астроцитов. Таким образом, расширение представления о патогенезе СЦА1, в частности, о роли астроцитов в развитии нейродегенерации при СЦА1, является актуальной задачей.

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

Анализ многочисленных научных зарубежных и отечественных публикаций по тематике диссертационной работы, полученные в диссертации результаты, их обсуждение, а также выводы позволяют заключить, что в целом, рассматриваемая диссертация является завершенным исследованием, отличающимся новизной, имеющим научную и практическую значимость. Автор грамотно применила современные методы исследований, в том числе использовала несколько моделей нейродегенерации; для оценки морфологических изменений ею были использованы методы иммуногистохимии и морфометрии, применение оптогенетики и электрофизиологических методов позволило оценить функциональные нарушения в работе мозжечка, а поведенческое тестирование животных позволило дать интегральную оценку нарушений. В работе использовано в целом достаточное количество экспериментальных животных, статистическая обработка проведена корректно, поэтому обоснованность и достоверность полученных результатов и выводов не вызывает сомнений. Сделанные выводы являются аргументированными, логичными и соответствуют полученным результатам. Положения, выносимые на защиту, соответствуют выводам, сформулированным автором.

Полученные результаты были обсуждены на конференциях всероссийского и международного уровня. Материалы диссертационного исследования в необходимом объеме 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.

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

## **Достоверность и научная новизна**

Для обоснования достоверности результатов применялись адекватные методы статистики, используемые выборки животных обладают достаточным объемом. Полученные результаты были обработаны с помощью современных методов статистического анализа. При обработке учитывался характер распределения полученных данных, для решения конкретных задач в каждом эксперименте применяли необходимый тип анализа.

Результаты диссертационного исследования Белозор О.С. углубляют существующие представления о патофизиологических механизмах нейродегенерации при СЦА1. Понимание механизмов возникновения патологии сделает возможным разработку более эффективных стратегий лечения СЦА1.

Автором разработаны модели ранней стадии астроглиоза с использованием методов оптогенетики. Эти модели могут быть полезны не только для исследования влияния активированных астроцитов на клетки Пуркинье мозжечка при СЦА1, но и при других нейродегенеративных заболеваниях мозжечка.

Автором выявлено, что изменение морфологии и функции глии Бергмана, наблюдаемое при астроглиозе, негативно влияет на морфологию клеток Пуркинье. В модельных мышцах отмечено снижение количества клеток Пуркинье и уменьшения толщины молекулярного слоя.

Выявлено, что астроглиоз приводит к нарушению обратного захвата нейромедиаторов из синаптической щели, что способствует удлинению времени восстановления ПВ ВПСТ и нарушению кратковременной и долговременной синаптической пластичности, а следовательно и памяти. Все эти механизмы лежат в основе развития эксайтотоксичности, нарушений морфологии и функции КП при СЦА1.

Данная работа имеет значение для фундаментальной науки в области исследования роли астроглии и патологических механизмов нейродегенерации. Разработанные модели астроглиоза позволят исследовать механизмы патологических процессов на начальных этапах различных нейродегенеративных заболеваний мозжечка.

## **Общая оценка диссертации**

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описанных материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка литературы. 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.

Рисунки (схемы и графики) в целом информативны, качественно выполнены, что демонстрируют достоверность полученных данных и профессиональное мастерство автора.

Во **введении** имеется вполне обоснованная и хорошо аргументированная постановка задачи исследования, приведена общая характеристика работы.

**Литературный обзор** заслуживает высокой оценки. Он хорошо написан, основан на анализе современной научной литературы и в достаточной степени знакомит читателя с основными вопросами, которые изучены автором в диссертации, включая патогенез спиноцеребеллярных атаксий, включая возможную роль глиальных клеток в патогенезе атаксий. Также рассмотрены различные варианты моделей атаксий. В качестве *небольшого замечания* отмечу, что дополнительные иллюстрации были бы уместны в этой

главе (например, структура белка атаксина 1; классификация моделей атаксии, иллюстрация оптогенетических инструментов и т.п.).

**Методы.** В работе использован очень широкий набор методов, но так как этот раздел диссертации изложен достаточно лаконично, то не вся необходимая информация оказалась приведена. Желательно привести данные об общем количестве животных, использованных в работе. Описание получения вирусных конструкторов слишком краткое, не указаны источники плазмид и пр. При описании ИГХ желательно приводить каталожные номера антител, так как эта информация критически важна. Неточно указан состав блокирующего раствора, почему-то в его составе указан только Triton X-100 (стр. 37).

Для анестезии в хронических экспериментах был использован хлоралгидрат, однако такое его применение не рекомендуется в современных руководствах, так как он не обладает достаточным анальгезирующим эффектом, а, кроме того, при внутрибрюшинном введении он может вызывать воспалительные реакции. Для маннитола указаны странные единицы измерения « $\mu\text{л}/\text{мг}$  массы тела».

*Вопросы и замечания по электрофизиологическим методикам:*

Стр. 39: срезы инкубировали во внеклеточном растворе, содержащем 0,1 мМ пикротоксина. С какой целью добавляли пикротоксин? Или это ошибка?

«Для записи использовались стеклянные электроды, заполненные внеклеточным раствором и внутриклеточным раствором». В каком случае использовали электроды, заполненные внеклеточным раствором? Вероятно, что слово «внеклеточным» попало по ошибке.

С какой целью в состав внутриклеточного раствора добавляли 5 мМ сахарозы (стр. 40)?

В работе используются неточные переводы англоязычных терминов, что затрудняет понимание смысла, например термин Paired-pulse facilitation (PPF) в работе переведено как «усиление парных импульсов (PPF)» (стр. 41), а Long-term depression (LTD) как «длительное синаптическое подавление» (стр. 41).

В методике не описано, как конкретно измеряли (рассчитывали) электрофизиологические показатели, нашел только часть на стр. 43.

*По статистике:*

В работе указано, что данные «представлены в виде  $M \pm SD$ , где  $M$  – среднее значение,  $SD$  – стандартная ошибка среднего» (стр. 43).  $SD$  – это обычно стандартное отклонение (Standard Deviation), тогда как для стандартной ошибки среднего используют обозначение SEM или SE (Standard Error of the Mean).

Какие апостериорные (*post hoc*) тесты делали при использовании дисперсионного анализа (ANOVA)?

**Результаты исследования** в целом хорошо документированы, грамотно обработаны, статистически проанализированы и четко изложены. Они кратко комментируются по ходу описания материала, что позволяет отследить всю логику проведенного исследования. Экспериментальная работа выполнена в полном соответствии с поставленными задачами и никаких принципиальных возражений не вызывает.

Однако при прочтении возник ряд вопросов и замечаний:

1. В работе не указывается, какой конкретно статистический тест использовался в каждом случае, не приводится его значение. Желательно также приводить значение теста, а только вероятность различий (например,  $t = 2.2, p < 0.05$ )/
2. Какой статистический анализ использовался для анализа Шолля (рис. 8), какие поправки на множественные сравнения были использованы? Что значит  $n = 10/3$ ?
3. Рисунок 9 и таблица 2 полностью дублируют друг друга, этого следует избегать. Не указано число измерений, не указаны использованные статистические тесты. Учитывались ли поправки на множественные сравнения. Аналогичное замечание к другим рисункам и таблицам (рис. 10 и таблица 3, рис. 12 и таблица 4).
4. Сведения о пассивных электрофизиологических свойствах мембраны (табл. 5) почему-то приведены в морфологическом разделе результатов. В работе желательно было привести примеры регистраций (электрофизиологических записей), на основе которых были получены эти данные.
5. Рисунок 13. Как сравнивали амплитуды ПВ ВПСТ? Если я правильно понимаю, то это вызванные ответы и их амплитуда будет зависеть от силы стимуляции ПВ. В работе не описано, как добивались сходных условий стимуляции и как проводилась стимуляция. Как измеряли амплитуды ВПСТ? на приведенных записях не видна базовая линия. Как измеряли время нарастания ответа? Если так, как указано на рис. 13Б, то такой способ очень странный – время считали до начала стимуляционного артефакта? Лучше использовать промежуток времени, на котором амплитуда изменяется от 20 до 80%. Как измеряли время спада? На панелях Б и В ответ не выходит на базовый уровень и оценить время спада сложно.
6. Рисунок 14В. Достоверность различий для первых двух столбиков вызывает сомнения. Приведите значения  $F$  и  $post hoc$  тестов.
7. Стр. 61. Методика voltage clamp как раз направлена на то, чтобы исключить эффект пассивных мембранных свойств нейрона на кинетику, которые меняют форму ответа при записи в current clamp. Изменение кинетики ответа ВПСТ зависит от сопротивления доступа, поэтому данные, приведенные на рис. 15 представляются рецензенту спорными.
8. Рисунок 18 и 19. Поясните, почему индивидуальные значения  $\tau_{PV}$  ВПСТ на рис. 18А меняются от 7 до 24 мс, а среднее значение по этим данным, приведенное на рис. 19 равно примерно  $30 \pm 5$  мс?
9. Раздел 3.5.1. Рецензенту не очевидно, как проводилась оценка PPF. Учитывая высокую вариативность электрофизиологических показателей, изменение величины PPF на 4% не кажется статистически значимым изменением.
10. Раздел 3.5.3. Для надежной оценки долговременной синаптической депрессии необходимо использовать большее количество наблюдений и животных ( $n=3$  животных, поэтому этот результат носит пока предварительный характер). Для оценки долговременной синаптической пластичности рекомендуется проводить регистрацию ответов после стимуляционного протокола от 40 минут и более. На рисунке 31, базовая линия построена по 2 точкам, что не позволяет сделать вывод о ее стабильности.

**Обсуждение результатов** проведено на хорошем профессиональном уровне. Этот раздел показывает, что диссертант отлично владеет материалом и может трактовать свои результаты в контексте современных представлений.

В **заключении** кратко приводятся основные этапы и результаты исследовательской работы. **Выводы** диссертационного исследования логически вытекают из изложенных результатов, соответствуют поставленным в работе цели и задачам.

### **Заключение**

Диссертационная работа Белозор Ольги Сергеевны «Роль астроглии в патогенезе спиноцеребеллярной атаксии первого типа», является законченной научно-квалификационной работой. По актуальности темы, новизне полученных данных и их научно-практической значимости, объему выполненных автором исследований диссертационная работа полностью соответствует требованиям пунктам 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,  
Главный научный сотрудник  
Федерального государственного бюджетного учреждения науки  
Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова  
Российской академии наук

дата 12.01.2023

Зайцев Алексей Васильевич

Подпись д.б.н. Зайцева А.В. заверяю



Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова

Российской академии наук

194223, Россия, г. Санкт-Петербург, проспект Тореза, д. 44, (812) 552-79-01; (812)552-30-58, [aleksey\\_zaitsev@mail.ru](mailto:aleksey_zaitsev@mail.ru), [https:// www.iephb.ru](https://www.iephb.ru)