

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Федотовой Анны Алексеевны «Особенности кальциевого и метаболического ответов астроцитов мышцы на локомоцию», представленную на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.24 – «нейробиология»

Актуальность темы исследования

Диссертационное исследование А.А. Федотовой посвящено изучению механизмов регуляции активности астроцитов в здоровом мозге. Интерес исследователей к этому направлению существенно повысился в последние две декады, когда стало очевидным, что значительная роль в реализации феномена нейропластичности принадлежит астроглии. Несмотря на то, что к настоящему времени идентифицированы основные механизмы активации астроцитов, связанные с синаптической активностью, нейровоспалением, осуществлением метаболической поддержки нейронов, регуляцией локальной микроциркуляции и проницаемости гематоэнцефалического барьера, контролем нейрогенеза, до сих пор отсутствуют обобщенные представления о том, как астроциты реагируют на изменение микроокружения, а также то, какие события в астроглии сопровождают поведенческие, когнитивные и моторные реакции.

Следует отметить, что дополнительную актуальность исследование А.А. Федотовой приобрело за счет его фокусирования на митохондриальной активности астроцитов: доминирующая точка зрения о том, что астроциты являются преимущественно гликолитически активными клетками, постепенно смещаются в сторону признания важности механизмов регуляции митохондриальной активности и динамики в астроглии в тесной взаимосвязи с энергетическими потребностями нейронов.

Не менее важной и интересной является предпринятая А.А. Федотовой попытка связать кальций-опосредованные ответы астроцитов с реакцией других клеточных компонентов нейроваскулярной единицы – нейронов и клеток микрососудов – на локомоцию и сложные виды поведения. Такие исследования актуальны не только в силу необходимости изучения фундаментальных механизмов высшей нервной деятельности, контроля движения, но и в контексте

разработки новых диагностических и терапевтических стратегий, технологий нейрореабилитации.

Таким образом, диссертация А.А. Федотовой является актуальным и современным исследованием, что определяет ее значимость для нейробиологии, (пато)физиологии нервной системы, неврологии.

Новизна проведенных исследований и полученных результатов

В рамках выполнения диссертационного исследования А.А. Федотовой получены результаты, обладающие несомненной научной новизной. Этого удалось достичь не только благодаря оригинальной научной гипотезе, которая легла в основу работы, но и за счет использования современных, оригинальных методов исследования и обработки полученных данных.

В числе наиболее интересных экспериментальных результатов следует упомянуть: а) кальций-зависимая генерализованная активация астроцитов при локомоции, не связанная с местоположением животного; б) развитие отсроченного и распределенного во времени кальциевого ответа в астроцитах при локомоции, сопряженного с изначальной генерацией кальциевого сигнала в дистальных отростках с последующим распространением по направлению к соме клеток и его амплификацией в этой части астроцита, сопровождающейся генерацией кальциевых осцилляций; в) воспроизводимость пространственного паттерна кальциевого ответа астроцитов соматосенсорной коры с более ранним ответом областей с исходной спонтанной кальциевой активностью клеток, вероятно, ассоциированной с работой внутриклеточных кальциевых депо – эндоплазматического ретикулума и митохондрий; г) наличие двух вариантов ответа – локомоция-зависимых и локомоция-независимых – в увеличении внутриклеточного уровня кальция в астроцитах при реализации сложных поведенческих тестов, в т.ч. при социальном распознавании; д) различная динамика кальциевого ответа в нейронах и астроцитах на локомоцию, а именно, задержка в астроцитах, вероятно, связанная с особенностями генерации кальциевых осцилляций; е) различный вклад системных и локальных (астроцит-опосредованных) механизмов увеличения доставки кислорода кровью в активные регионы мозга; ж) существенные отличия в состоянии электрон-транспортной

цепи митохондрий нейронов и астроцитов при их активации: увеличение восстановленных цитохромов *c* и *b* в астроцитах, и снижение – в нейронах.

В целом, автору удалось впервые показать, как реализуется ответ астроцитов, сопряженный с изменением их метаболической активности и внутриклеточных осцилляций кальция, на активность нейронов при локомоции, и как такое сопряжение нейронов и астроцитов обеспечивает тонкую настройку локальной микроциркуляции к увеличенным запросам активированных нейронов в нутриентах и кислороде. Иными словами, автору удалось расширить существующие представления о нейрон-астроцитарном метаболическом сопряжении, которое традиционно ассоциируется с лактат-продуцирующей активностью астроглии и захватом лактата рядом расположенными нейронами, а также о глиоваскулярном контроле микроциркуляции, связанном с высвобождением из астроцитов вазоактивных молекул, за счет новых данных о кальций-опосредованных механизмах регуляции межклеточных взаимодействий и дифференцированном ответе митохондрий в обоих типах клеток на внешнее воздействие. Эти экспериментальные находки вносят значимый вклад в понимание фундаментальных механизмов функционирования головного мозга и будут полезны при разработке новых методов диагностики и терапии нейродегенерации, ишемии, нейровоспаления.

Считаю, что все основные результаты, представленные в работе, обладают несомненной научной новизной, свидетельствуют о достижении цели и решении задач исследования.

Степень обоснованности научных положений, выводов, сформулированных в диссертации, их достоверность и новизна

Подтверждением того, что научные положения, выносимые на защиту, и выводы диссертации обоснованы и достоверны, является: а) использование комплекса методов (нейробиологические, молекулярно-генетические, хирургические, нейроповеденческие, спектральные, а также методы статистического анализа), удачно дополняющих друг друга и позволяющих рассмотреть различные аспекты нейрон-астроглиальных взаимодействий с разных точек зрения; б) разработка принципиально новых и оригинальных методических

подходов, их валидация на экспериментальных моделях, в частности, применение протоколов рамановской микроспектроскопии, позволяющих осуществлять мониторинг редокс-состояния митохондрий клеток мозга в сочетании с оценкой оксигенации ткани *in vivo*; в) выполненный автором глубокий анализ существующих представлений о роли астроцитов в головном мозге, о механизмах межклеточной коммуникации, о кальциевых механизмах сигнальной трансдукции и их регуляции в клетках астроглии, о способах оценки метаболического и функционального сопряжения клеток нейроваскулярной единицы, позволивший идентифицировать до сих пор не решенные вопросы в биологии астроглии; г) реализация интегративного подхода к решению поставленных исследовательских задач в парадигме «от молекулы и клетки – к поведению»; д) скрупулезное отношение автора к дизайну экспериментов в части подготовки животных, подбора оптимальных условий и оценке эффективности применения методов трансфекции, визуализации, применения различных вариантов контрольных групп и серий, обработке данных (в том числе с использованием специально разработанного программного обеспечения) для исключения артефактов и обеспечения качества получаемых результатов; е) представление и обсуждение результатов на российских и международных конференциях, в профильных журналах (автором опубликовано 14 печатных работ, из них 4 статьи - в периодических изданиях, индексируемых в международных базах данных).

На основании изложенного считаю, что в диссертации А.А. Федотовой представлены и обобщены данные, обладающие обоснованностью и достоверностью.

Значимость для науки и практики выводов и рекомендаций

Теоретическая ценность полученных данных для фундаментальной науки (нейробиология, физиология, патофизиология) заключается в расшифровке поддержки ключевых механизмов синаптической пластичности, в идентификации новых аспектов роли астроцитов в формировании и поддержании т.н. активной среды мозга, в демонстрации особенностей кальциевого ответа астроглии на стимуляцию при локомоции (развитие кальциевых осцилляций, интеграция и амплификация кальциевого ответа в some клетки) и при реализации сложных

форм поведения (социальное поведение), в подтверждении принципиально различных ответов митохондрий нейронов и астроцитов на активацию клеток, в регистрации новых механизмов адаптации локальной микроциркуляции к метаболическим нуждам активированных нейронов.

Практическая ценность диссертационного исследования для решения задач в области неврологии, нейрофармакологии, трансляционной медицины связана с возможностью использования его результатов при идентификации новых молекул-мишеней для терапии и молекул-маркеров для диагностики, при применении предлагаемых экспериментальных подходов в протоколах тестирования эффектов лекарств-кандидатов в отношении клеток нейроваскулярной единицы, при разработке новых протоколов регистрации функциональной активности клеток нейрональной и глиальной природы в контексте аберрантной пластичности мозга при его повреждении, нейродегенерации, ишемии и нейровоспалении, а также при разработке методов коррекции неврологических дефицитов и восстановления функциональной активности головного мозга.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

Считаю, что результаты диссертационного исследования А.А. Федотовой могут быть рекомендованы к использованию в следующих областях: а) нейробиология – при изучении механизмов пластичности мозга, нейрон-глиальных взаимодействий, метаболического сопряжения клеток, клеточно-молекулярных основ интегративных функций мозга, а также при разработке новых экспериментальных моделей, позволяющих оценивать вклад механизмов внутриклеточной сигнализации и межклеточной коммуникации в реализацию сложных форм поведения и моторики; б) физиология и патофизиология нервной системы – при изучении механизмов регуляции функционального активности клеток головного мозга, при оценке влияния внешних факторов и микроокружения на функционирование мультиклеточных ансамблей в ткани головного мозга, при изучении патогенеза заболеваний головного мозга, связанных с нарушением нейрон-астроглиального метаболического сопряжения,

развитием и прогрессированием митохондриальной дисфункции, изменением локальной микроциркуляции; в) биофизика и биохимия нервной системы – при изучении механизмов сигнальной трансдукции, кальциевого обмена в нейронах и астроцитах, митохондриальной активности в клетках с разными доминирующими механизмами энергообеспечения, при разработке новых исследовательских протоколов для визуализации и анализа процессов активации клеток, в том числе на субклеточном уровне, а также для оценки редокс-механизмов в клетках, анализа метаболического статуса отдельных клеток в гетерогенных клеточных популяциях; г) фармакология – при разработке протоколов поиска новых молекул-мишеней и лекарств-кандидатов для фармакологической коррекции повреждения головного мозга; д) трансляционные нейронауки – при разработке новых моделей заболеваний центральной нервной системы; е) высшее профессиональное образование в области нейробиологии, физиологии и медицины. Все указанные направления могут быть реализованы в университетах и академических центрах Российской Федерации.

Оценка содержания диссертации в целом. Диссертация А.А. Федотовой изложена на 124 страницах, состоит из введения, трех глав, общего заключения, выводов, списка литературы, содержит глоссарий и список благодарностей автора. Работа написана хорошим академическим языком, читается с интересом, иллюстрирована рисунками и таблицами высокого качества.

Во **введении** автором раскрыты актуальность работы и научная новизна исследования, сформулированы цель и задачи исследования, научная и практическая ценность работы.

Глава 1 диссертации представляет собой обзор литературы. Он хорошо структурирован, демонстрирует высокий уровень владения автором современным материалом по проблематике работы, в нем приведены исчерпывающие сведения о различных аспектах рассматриваемых механизмов. Автором проанализированы представления о межклеточной коммуникации в нейроваскулярной единице головного мозга, о механизмах поддержания кальциевого гомеостаза в астроглии, о кальций-зависимых механизмах ответа астроцитов на внешние воздействия, в том числе при движении и реализации сложных форм поведения, во сне, при

различных эмоциональных состояниях, при обучении и запоминании информации. Автор легко и логично связывает между собой данные о морфологии, функциональной активности клеток, особенностях их метаболизма, а также способах оценки этих механизмов, подчеркивая преимущества и ограничения каждого метода. Обзор литературы завершен кратким резюме, позволившим акцентировать наименее изученные аспекты изучаемой проблемы.

В **главе 2** приводятся сведения об использованных автором материалах и методах. Этот раздел диссертации достаточно детализован, содержит исчерпывающую информацию о дизайне работы, о последовательности выполнения различных протоколов. Стиль раздела подтверждает погружение автора в исследуемые вопросы, а также широкий кругозор А.А. Федотовой, в равной степени успешно описывающей молекулярно-генетические, нейробиологические, биофизические, математические и иные протоколы. Следует отметить то, что эта глава содержит большое количество рисунков и фотографий, что, несомненно, дает возможность дополнительно убедиться в тщательно продуманном и реализованном дизайне, а также в наличии контроля качества экспериментов на всех этапах их выполнения.

Глава 3 диссертации посвящена описанию результатов исследования. Эта глава отлично иллюстрирована, хорошо структурирована. При изложении полученных данных автор обращается к анализу современной литературы, однако соблюдает необходимый баланс в описании собственных результатов и их сравнении с имеющимися в литературе данными. Считаю важным отметить то, что существенным достоинством этой главы является описание оригинальных способов обработки полученных данных, в том числе с использованием специально разработанного программ и протоколов. Каждый раздел этой главы заканчивается кратким резюмирующим тезисом, который не только фокусирует внимание на основных находках автора, но и обеспечивает сохранение общей логики работы.

В **Заключении** А.А. Федотова обобщает ключевые результаты исследования. Этот раздел диссертации является небольшим по объему, но он удачно суммирует самые интересные и важные экспериментальные находки, в

том числе в виде резюмирующей схемы (рис. 60). Несомненным достоинством этой части диссертации является заключительное предположение автора о дальнейших направлениях исследований, которые могли бы развить полученные результаты.

Автореферат соответствует содержанию диссертации, хорошо структурирован, иллюстрирован, достаточно информативен. Замечаний принципиального характера по автореферату нет.

В целом, работа производит хорошее целостное впечатление, однако при знакомстве с диссертацией возник **ряд замечаний и комментариев:**

1) В тексте диссертации присутствуют единичные неудачные стилистические, в том числе переводные, обороты (например, «гликолизный АТФ», «нейромодуляторные проекции», «десенситизация» и др.).

2) Рисунки, размещенные в разделе «Обзор литературы», являются не оригинальными, а заимствованными (с указанием на источник). Полагаю, что автору следовало бы использовать только оригинальные рисунки. Рисунок 3 является явно лишним, так как содержит информацию, которая обычно приводится в базовых учебниках и руководствах, и сопровождается описанием работы электрон-транспортной цепи митохондрий, которое диссонирует стилю изложения в диссертации в силу своей очевидной «хрестоматийности».

3) Полагаю, что глава «Материалы и методы» выиграла бы от рисунка (схемы), интегрирующего все этапы и методы исследования в единую логическую цепочку, с указанием групп и серий, а также количества животных в каждой из них.

Все указанные замечания не носят концептуального характера и не влияют на общее, сугубо положительное впечатление о работе.

В порядке научной дискуссии хотелось бы задать автору **следующие вопросы:**

1) При обсуждении результатов автор упоминает о функционировании единого астроглиального синцития. Насколько, по мнению автора, межклеточное коннексон-опосредованное распространение кальциевого сигнала может влиять на аккумуляцию и амплификацию кальциевого ответа в каждом конкретном

астроците? Может ли работа астроглиальной сети быть ответственной за обнаруженное запаздывание кальциевого сигнала в астроцитах?

2) Известно, что секреция глиотрансмиттеров в значительной степени зависит от кальциевой сигнализации в астроцитах. Насколько обнаруженные автором пространственные отличия кальциевого ответа в отростках и some соответствуют существующим моделям, описывающим кальций-регулируемое высвобождение глиотрансмиттеров из активированных клеток астроглии?

3) Различия в энергопродукции нейронов и астроцитов хорошо известны: гликолитическая активность астроцитов необходима для продукции и последующего транспорта лактата в активированные нейроны, что важно для поддержания работы электрон-транспортной цепи митохондрий. Как, по мнению автора, эта теория метаболического сопряжения дополняется результатами, свидетельствующими о разной функциональной активности компонентов дыхательной цепи митохондрий в нейронах и астроцитах в активных регионах мозга?

4) Следует ли ожидать развитие окислительного стресса в клетках вследствие поступления в активные регионы мозга избыточного, по мнению автора, количества кислорода, превышающего метаболические потребности ткани? Какова потенциальная роль различных по своей активности и, вероятно, динамике, митохондрий нейронов и астроцитов в таком «побочном эффекте» функциональной гиперемии?

Заключение

Считаю, что диссертация Анны Алексеевны Федотовой «Особенности кальциевого и метаболического ответов астроцитов мышцы на локомоцию» полностью соответствует требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 1.5.24 – «Нейробиология» по биологическим наукам (в частности, пп. 2, 3, 4, 14), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 «Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова».

Диссертация оформлена согласно приложениям № 5, 6 «Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова».

Таким образом, соискатель Федотова Анна Алексеевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.24– «Нейробиология».

Официальный оппонент:

Главный научный сотрудник и заведующий лабораторией нейробиологии и тканевой инженерии отдела молекулярных и клеточных механизмов нейропластичности Института мозга

федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научный центр неврологии», доктор медицинских наук (3.3.3 – «патологическая физиология»), профессор

Алла Борисовна Салмина



Подпись доктора медицинских наук, профессора Салминой А.Б. удостоверяю:

Учёный секретарь Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научный центр неврологии», старший научный сотрудник, кандидат медицинских наук

Дмитрий Владимирович Сергеев

13 ноября 2023 г.



Контактные данные:

Салмина Алла Борисовна

Главный научный сотрудник и заведующий лабораторией нейробиологии и тканевой инженерии, доктор медицинских наук, профессор

Место работы и адрес работы: федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научный центр неврологии», Россия, 125367, г. Москва, Волоколамское шоссе, д.80

Телефон рабочий: 7(495) 917-09-99

Адрес эл почты:

Специальность 3.3.3 – «патологическая физиология».