

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических наук Федотовой Анны Алексеевны на тему: «Особенности кальциевого и метаболического ответов астроцитов мышцы на локомоцию» по специальности 1.5.24 – «Нейробиология»

Актуальность темы исследования

Диссертационная работа Анны Алексеевны Федотовой посвящена исследованию функциональных ответов астроцитов, нейронов и кровеносных сосудов головного мозга мышцы на локомоцию с фокусом на изменениях внутриклеточной концентрации свободного Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) в цитоплазме астроцитов (Ca^{2+} активности). Прежде всего, хочется отметить удачную и лаконичную формулировку названия, объединяющую в логически единое очень разные использованные методы и методические приемы.

Высокая актуальность темы исследования связана с важнейшей ролью наиболее универсального внутриклеточного мессенджера во всех типах клеток – ионов кальция. Ca^{2+} сигнализация в астроцитах активно влияет на синаптическую пластичность, регуляцию сосудистого тонуса, на разнообразные аспекты клеточного метаболизма, а также их изменения при развитии патологий. Последнее представляет особый интерес, поскольку одной из важнейших задач современной нейробиологии является поиск клеточных мишеней для терапии заболеваний нервной системы, начиная с генетически обусловленных орфанных болезней, онкологий мозга и заканчивая возрастными деменциями, которые бывают связаны с нарушением функционирования астроцитов. Исследования активности мозга *in vivo* оптическими методами весьма сложны. Несмотря на значительный рост количества подобных работ в последнее десятилетие, исследований Ca^{2+} активности астроцитов у бодрствующих животных пока единицы. По этой причине диссертационное исследование Анны Алексеевны по методической оснащённости, комплексности экспериментальных подходов и приёмам

максимального извлечения информации из получаемых данных безусловно является не только актуальным, но и пионерским.

Структура и содержание диссертации

Диссертация Анны Алексеевны построена классическим образом, включает «Глоссарий» и «Список сокращений», а также главы: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы» и завершается «Списком литературы», включающим 191 источник. Текст диссертации изложен на 124 страницах, содержит 60 рисунков и 1 таблицу.

Во «**Введении**» обсуждаются актуальность и степень разработанности исследуемой темы, сформулированы цель и задачи исследования, обоснована научная новизна работы, её теоретическая и практическая значимость. Приведено сжатое описание методов исследования, дающее представление о сложности, многообразии и новизне методологии. Перечислены положения, выносимые на защиту, указаны сведения о публикациях, а также о представлении результатов диссертационной работы на конференциях и личном вкладе автора.

Обзор литературы цитирует 141 публикацию из 191, включенных в общий Список литературы. Необходимо отметить, что 41% статей, приведенных в списке, опубликован в последние 5 лет, что подчеркивает возрастающую актуальность проблемы в мировой нейробиологии, а также свидетельствует о внимании Анны Алексеевны к передовым направлениям в исследованиях функционирования астроцитов, их взаимодействия с нейронами, с системой гемостаза головного мозга и выяснении того, как локомоция животных количественно сопряжена с указанными характеристиками их мозга. Заслуживает упоминания то, что Обзор литературы завершается кратким итогом проанализированного литературного материала и обосновывает актуальность исследований, описанных в последующих главах диссертационной работы.

Глава «**Материалы и Методы**» включает детальное описание всех методических вопросов. В работе очень гармонично подобраны современные молекулярно-биологические, физиологические, биофизические и гистологические методы исследования. Для этого Анной Алексеевной и ее коллегами выполнен огромный объем работы: 1) создание вирусного вектора на основе AAV для доставки генетически кодируемого Ca^{2+} сенсора GCaMP6f и различных флуоресцентных меток в различные зоны мозга мыши; 2) отработана процедура стереотаксической доставки вирусного конструкта, включая ювелирные по прецизионности и очень трудоемкие микрохирургические операции по изготовлению хронического краниального окна над соматосенсорной корой и имплантации оптоволокон в гиппокамп; 3) интракардиальная перфузия мышей; 4) приготовление срезов мозга, их иммуногистохимическая окраска и последующее фотометрирование; 5) *in vivo* Ca^{2+} имиджинг с помощью мультифотонной микроскопии с билатеральной регистрацией динамики $[Ca^{2+}]_i$ от астроцитов гиппокампа; 6) мониторинг локальной оксигенации крови и изучение редокс-состояния цитохромов дыхательной цепи митохондрий астроцитов и нейронов в коре головного мозга мыши при помощи уникального подхода, основанного на микроспектроскопии комбинационного рассеяния света (КР, или рамановской, спектроскопии). Эксперименты по изучению Ca^{2+} сигнализации в астроцитах, редокс-состояния митохондрий и локальной оксигенации крови в сосудах проведены на бодрствующих, «свободно движущихся» мышах, что представляет особую ценность, поскольку позволяет изучать явления в интактном мозге и оценивать, как изменения $[Ca^{2+}]_i$ в астроцитах и нейронах соматосенсорной коры и гиппокампа сопряжены с подвижностью экспериментальных животных. В целом текст и иллюстрации главы «Материалы и методы» создают впечатление исследования, выполненного на очень высоком и разнообразном методическом уровне, а использованные подходы и методы совершенно адекватны для успешного решения поставленных в диссертации задач.

Глава «**Результаты и обсуждение**» включает в себя описание и анализ большого объема экспериментальных данных и логично разделена на 6 разделов, в каждом из которых Анна Алексеевна подробно описывает результаты экспериментов, приводя соответствующие графики. Глава «Результаты и обсуждение» иллюстрирована 40 рисунками с детальным описанием графиков и/или изображений. Следует отметить, что автор, анализируя собственные уникальные данные, сопоставляла их с наиболее свежими литературными данными по темам, соответствующим как параграфам главы «Результаты и обсуждение», так и разделам в «Обзоре литературы».

В разделе «**Заключение**» Анна Алексеевна суммировала результаты в виде итоговой обобщающей схемы, отражающей согласованный ответ взаимосвязанных компонентов мозга мыши (астроцитов, нейронов, кровеносных сосудов) на локомоцию, что является несомненным достоинством текста диссертации и позволяет наглядно проследить ключевые результаты проведенного исследования. Финальная часть диссертационной создает твердое убеждение, что работа Анны Алексеевны выполнена на очень высоком и разнообразном теоретическом и методическом уровне, что автор умело обобщает полученные результаты и профессионально прогнозирует направление будущих исследований.

Выводы сформулированы сжато и четко, без излишних подробностей, полностью основаны на полученных результатах и соответствуют поставленным цели и задачам.

Научная новизна работы

Научная новизна работы не вызывает сомнений. Анна Алексеевна впервые провела комплексное исследование ответов астроцитов, нейронов и кровеносных сосудов соматосенсорной коры мыши на локомоцию. Автор провела тщательный анализ развития Ca^{2+} ответов, а именно, локальных изменений $[Ca^{2+}]_i$ в цитоплазме астроцитов в пространстве и времени как на

уровне популяции, так и в одиночных клетках. Благодаря регистрации Ca^{2+} динамики с субклеточным разрешением, Анне Алексеевне удалось впервые обнаружить осцилляции $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в условиях *in vivo*, ранее показанные только в работах на срезах мозга и клеточных культурах, а также изящно продемонстрировать интегративную функцию астроцитов. Особый интерес представляет глава, посвященная исследованию фундаментальных различий Ca^{2+} активности в астроцитах и нейронах, где автор приводит новейшие данные об изменении $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в ответ на последовательные эпизоды локомоции и заявляет о наличии рефрактерности в активности астроцитов, совершенно не изученной ранее. Исследование дополнено данными о динамике $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в астроцитах гиппокампа свободноподвижных мышей в тестах на социальность и социальную новизну. Такие эксперименты проведены впервые в мире и вносят принципиальный вклад в понимание работы астроцитов и ее связи с поведением. Астроциты являются связующим звеном между нейронами и кровеносными сосудами, в связи с чем Анна Алексеевна провела мониторинг степени оксигенации крови в моменты остановки и движения животного и получила первые сведения об изменении локальной оксигенации крови в артериолах и венах соматосенсорной коры мышей. Поскольку ионы Ca^{2+} являются важнейшим вторичным мессенджером и вовлечены в регуляцию многих внутриклеточных процессов, среди которых ключевое значение имеет клеточный метаболизм, в особенности связанный с функционированием митохондрий, диссертант посвятила последнюю главу исследования изучению окислительного фосфорилирования в астроцитах и нейронах. В результате экспериментов с применением микроспектроскопии комбинационного рассеяния света, которые в условиях *in vivo* были выполнены впервые в мире, обнаружены функциональные различия в работе дыхательной цепи митохондрий астроцитов и нейронов при локомоции.

Степень обоснованности и достоверности выводов и основных положений диссертации

Сформулированные в диссертационной работе научные положения и выводы основываются на достаточном объеме экспериментального материала, полученного с помощью соответствующих поставленным задачам методов и подходов. В работе использованы самые современные методики, применены адекватные методы статистической обработки данных. Результаты научного исследования опубликованы в 4 статьях в ведущих журналах, индексируемых аналитическими базами Scopus и Web of Science, относящихся к первому и второму квартилям (Q1 и Q2), а также представлены на 10 международных и всероссийских конференциях, по результатам которых опубликовано трое тезисов в рецензируемых журналах и 7 тезисов в сборниках материалов конференций. Факты публикации в высокорейтинговых журналах и доклады на международных конференциях надежно подтверждают достоверность полученных результатов. Однако в экспериментах *in vivo* особое внимание следует уделять математической обработке результатов, без которой невозможно извлечь полезную информацию, а также статистической достоверности результатов. Считаем важным подчеркнуть, что диссертант адекватно справилась с этой трудной задачей.

Замечания и вопросы по диссертации

1. Обзор литературы дает достаточно полное представление о многогранной тематике диссертационного исследования, однако стоило, на наш взгляд, ввести параграф, описывающий принципы спектроскопии комбинационного рассеяния света (КР-спектроскопии, рамановской спектроскопии) и отметить уникальные возможности этого метода для измерений *in vivo*.
2. В разделе «Глоссарий» и главе «Материалы и Методы» (стр. 53) даны разные определения параметра $\Delta F/F$. В первом случае знаменатель F назван «базовым уровнем», во втором – «фоновой флуоресценцией», однако использования терминов «базовый» и «фоновый» как синонимов не очевидно.

При измерениях содержания внутриклеточного Ca^{2+} базальным принято называть значения сигнала Ca^{2+} индикатора в покоеющихся клетках, тогда как фоновым обычно называют интенсивность внеклеточного излучения, принадлежащего рассеянному свету и/или флуоресцирующим компонентам внеклеточной среды.

3. «...распространение Ca^{2+} активности в астроците от дистальных отростков к соме, где происходит ее усиление ...». Автор, очевидно, имела ввиду усиление активности, а не усиление сомы.

4. Стр. 61. «... сегменты Ca^{2+} событий (Ca^{2+} сегменты), то есть связанные пиксели в пределах кадра, в которых значение $\Delta F/F$ превышало заданный порог 15%.» Автор не обосновывает выбор именно такой величины «порога»; не ясно, насколько изменились бы результаты и выводы при большем или меньшем значении «порога». Тот же вопрос относится к обоснованию выбора порога локомоции 0,5 см/с.

5. Амплитуда параметра $\Delta F/F$ в астроцитах при повторном эпизоде локомоции может быть ниже амплитуды $\Delta F/F$ при первом эпизоде по причине того, что повышение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ сопровождается снижением рН в цитоплазме эукариотических клеток. Все флуоресцентные белки, в том числе в составе сенсоров, снижают интенсивность при закислении среды. Необходимо пояснить, может ли снижение $\Delta F/F$ при повторном эпизоде локомоции быть связанным, по крайней мере отчасти, с указанным свойством флуоресцентного белка в составе кальциевого сенсора GCaMP6f?

6. Может ли отсутствие изменений в степени восстановления цитохромов ЭТЦ митохондрий астроцитов при повторном эпизоде локомоции быть связано с тем, что в этом случае $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в астроцитах не достигает порогового значения 0,5-1 мкМ, необходимого для открывания митохондриального кальциевого унипортера?

Заключение

Диссертационная работа Федотовой А.А. представляет собой полноценное, грамотно спланированное и тщательно выполненное научное исследование на актуальную тему, имеющую как фундаментальное, так и практическое значение. Отмеченные выше замечания носят технический характер, являются скорее советами по улучшению, чем констатацией серьезных ошибок, проявлением интереса к результатам и не умаляют научную ценность диссертационной работы. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом им. М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 1.5.24 – «Нейробиология» по биологическим наукам, а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете им. М.В. Ломоносова, а также оформлена, согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова.

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

Сурин Александр Михайлович

главный научный сотрудник, доктор биологических наук
Специальность 3.3.3 – Патологическая физиология

Место работы: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», Отдел общей патофизиологии, Лаборатория фундаментальных и прикладных проблем боли.

125315, Москва, ул. Балтийская, д.8

Тел: +7 (916)498-9413

e-mail:

Подпись д.б.н. Сурина А.М. заверяю:
Ученый секретарь ФГБНУ «НИИОП»

К.М.Н.



Кожнев

Е.Н. Кожевникова

13.11.2023