

**ОТЗЫВ официального оппонента
о диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук Тяглик Алисы Борисовны
на тему: «Роль метаболической активности и морфологической
пластичности астроцитов в мозге»
по специальности 1.5.24. Нейробиология**

Актуальность избранной темы

Хорошо известно, что астроглия является абсолютно необходимым элементом нервной ткани, обеспечивающим поддержку метаболизма, круговорот нейромедиаторов и стабилизацию микросреды высокоактивных групп нейронов. Ансамбли, включающие тесно взаимодействующие нейроны, астроциты, элементы стенки капилляров, фактически являются функциональными комплексами в ЦНС. Тем не менее, молекулярные механизмы интеграции, координации и взаимовлияния в глио-нейрональных ансамблях исследованы недостаточно вследствие высокой динамичности и пластичности клеточных процессов, субклеточных структур и метаболических сетей астроцитов и нейронов. Работа Алисы Борисовны Тяглик направлена на исследование координации энергетических процессов, а также молекулярной-структурных основ астроцитарно-нейронального взаимодействия в условиях *in vivo*. Тема работы А.Б. Тяглик является крайне актуальной, поскольку только технологии *in vivo*-визуализации метаболической активности в шкалах «реального времени» позволяют получить новые данные о динамической роли астроцитов в формировании микроусловий для нейронов, их роли в локальном челночном межклеточном транспорте макроэнергетических соединений, а также - в синтезе и высвобождении регуляторных соединений, сопрягающих метаболический статус клеток с такими системными факторами, как уровень перфузии и доступность кислорода. Несомненно, тема работы, выполненные эксперименты, область исследований диссертации Тяглик А.Б. соответствуют

специальности 1.5.24. Нейробиология.

Структура и объём диссертации

Диссертация изложена на 157 страницах. Диссертация начинается с раздела «введение», в котором дается краткое обоснование проблемы, ставятся цель и задачи исследования.

Далее следуют обзор литературы, описание материалов и методов, используемых в исследовании, описание результатов, их обсуждение, заключение и выводы. Завершается диссертация списком цитируемых источников, который включает 192 наименования. Работа проиллюстрирована 56 рисунками.

Обзор литературы достаточно полно раскрывает известные к настоящему моменту сведения в исследуемой области: в обзоре литературы приведены данные о энергетическом метаболизме нейронов и астроцитов, рассмотрены основные механизмы регуляции окислительного фосфорилирования и гликолиза в двух типах клеток, представлены сведения о молекулярных особенностях электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) митохондрий нейронов и астроцитов, сведения о причинах нарушения нормальной активности ЭТЦ и условиях генерации в них активных форм кислорода (АФК), приведено описание цитоархитектоники астроцитов, а также описана роль астроцитарных клеток в поддержании синаптической нейротрансмиссии. В обзоре литературы рассмотрены работы как отечественных ученых, так и зарубежных научных групп. В обзоре литературы автор использует наиболее современные источники, касающиеся темы работы, а также алгоритмов анализа спектральных характеристик, методов фильтрации сигналов, способов квантификации структурных характеристик клеток. Обзор литературы позволяет заключить, что автор отлично ориентируется в исследуемой области нейрофизиологии,

демонстрирует знание современного состояния проблемы нейро-глиального взаимодействия.

Раздел «Материалы и методы» даёт детальное представление об экспериментальных подходах, используемых в данном исследовании. В разделе «материалы и методы» Алиса Борисовна приводит описание групп животных, экспериментальных *in vivo* моделей острой гипергликемии и дислипидемии, обусловленной высокожировой диетой. Автор приводит описание способов доступа к участкам коры головного мозга животных *in vivo*, способов регистрации спектров комбинационного (Рамановского) рассеяния *in vivo*, а также способов идентификации типов клеток для дальнейшей КР-спектromетрии.

В разделе «результаты и обсуждение» приведено детальное описание полученных в работе данных. Раздел содержит четыре части, касающиеся описания КР-спектров астроцитов в покое и при локомоторной активности животного, внутриклеточного распределения митохондрий в астроцитах и нейронах *in vivo*, окислительно-восстановительного состояния компонентов ЭТЦ в двух типах клеток при острой гипергликемии, хронической дислипидемии, а также сведения о влиянии нокдауна эзрина на морфологические характеристики астроцитов. Результаты исследования представлены в форме, общепринятой для научной литературы.

В разделе «результаты и обсуждение» Тяглик А.Б. проведен детальный анализ и интерпретация полученных результатов. Автор приводит несколько гипотез, которые, объясняют наблюдаемые в экспериментах феномены и, в частности, позволяют механистически связать макромолекулярные свойства ЭТЦ с ролью астроцитов в метаболической поддержке нейронов, регуляции локального кровотока.

Раздел «заключение» обобщает полученные в работе сведения. В заключении кратко и ясно сформулированы результаты исследования, продемонстрирована практическая значимость фундаментального

исследования глио-нейрональной метаболической координации на уровне ЭТЦ клеток.

Приведенные в конце работы выводы, сформулированы кратко, логично. Выводы, сделанные в работе, обоснованы, базируются на полученных автором данных экспериментов, соответствуют цели исследования и поставленным задачам.

Иллюстративный материал в достаточном объеме раскрывает и обосновывает полученные экспериментальные результаты.

Научная новизна результатов и обоснованность основных положений диссертации, выносимых на защиту

Диссертационное исследование Тяглик А.Б. обладает несомненной научной новизной. В работе Алисы Борисовны впервые выявлено несколько феноменов, астроглии гиппокампа и соматосенсорной коры мозга грызунов.

Во-первых, автором установлено, что в ЭТЦ специфических субклеточных участков астроцитов при локомоторной активности происходит насыщение электронами, чего не наблюдается в спаренных с астроцитами нейронах. Автором впервые предложена гипотеза, согласно которой обогащение ЭТЦ астроцитов электронами способствует продукции ими определенных АФК, что, в свою очередь, приводит к локальной вазодилатации, возможно, к увеличению интенсивности кровотока, и может быть описано как «функциональная гиперемия». Во-вторых, автором впервые показано, что обогащение ЭТЦ электронами при локомоторной активности в астроцитах способствует накоплению в них лактата и стимуляции лактатного астро-нейронального челночного механизма с последующим переносом лактата в цитоплазму нейронов, накоплению пирувата в нейрональных митохондриях и активации в них окислительного фосфорилирования. Автором впервые сделано предположение, что функциональные различия ЭТЦ обусловлены особенностями интеграции и колоколизации

мультибелковых комплексов в внутренней мембране митохондрий, но не глобальными различиями в организации и количестве органелл.

Автором диссертации также впервые установлено, что гипергликемия, как и высокожировая диета приводят к увеличению количества восстановленных цитохромов с- и b-типов, накоплению электронов в ЭТЦ преимущественно астроцитов, что сопровождается усилением продукции АФК, и, вероятно, способствует защите нейронов от повреждений, обусловленных перегрузкой ЭТЦ. Наконец, автор впервые выявил и исследовал роль структурного белка эзрина в поддержании нейро-глиальной интеграции.

Выносимые на защиту положения являются обоснованными, поскольку автором выполнен значительный объем экспериментов с использованием целого спектра методик. Автором проведен анализ как структурных, так и функциональных особенностей астроцитов. Многосторонний подход обеспечил автору комплексную оценку роли астроцитов, как метаболических «компаньонов» нейронов и регуляторов синаптической нейротрансмиссии.

Теоретическая и практическая значимость работы

Работа Тяглик А.Б имеет как теоретическое, фундаментальное, так и прикладное значение. Фундаментальное значение работы заключается в том, что автором выявлены новые закономерности работы ЭТЦ митохондрий нейронов и астроцитов, а также впервые продемонстрированы новые аспекты координации энергетического метаболизма нейронов и астроцитов. Теоретическая значимость работы определяется выявлением нового феномена – АФК-зависимой вазодилатацией, осуществляемой с участием активных астроцитов, а также субклеточной гетерогенности состояния ЭТЦ митохондрий астроцитов. Важным теоретическим достижением является установление автором факта эзрин-зависимого ремоделирования мембранных структур астроцитов, участвующих в метаболической и функциональной поддержке синапсов.

С прикладной точки зрения результаты работы Тяглик А.Б. значимы тем, что способствуют пониманию патологических процессов в нейро-астроцитарных единицах, развивающихся при метаболическом синдроме, гипергликемии или дислипидемиях.

Достоверность результатов и выводов исследования

Результаты исследования являются в высокой степени достоверными. Рассмотрение особенностей окислительного фосфорилирования и гликолиза, в совокупности с активностью ЭТЦ нейронов и астроцитов выполнено всесторонне на максимально возможном уровне.

Для решения поставленных задач автором применены адекватные, современные, общепризнанные методические подходы, включающие *in vivo* модели, методику *in vivo* трансдукции, методику регистрации и анализа спектров комбинационного рассеяния, визуализацию нейронов и астроцитов с помощью направленной клеточно-избирательной экспрессией флуоресцентных репортерных белков, методы анализа и 3D реконструкции структуры митохондрий, субклеточных элементов астроцитов после генетически-индуцированного нокдауна экспрессии белков цитоскелета. Автор использовал современное, специализированное научное оборудование.

Используемые в исследовании подходы для оценки наполненности и активности ЭТЦ на основе определения специфических пиков спектра рамановского рассеяния являются известными, хорошо описанными в экспериментальных работах, достаточно воспроизводимы.

Использованная совокупность *in vivo* подходов, флуоресцентных, генетических методов, методов анализа спектров и изображений позволила автору выявить новые аспекты координации энергетического метаболизма нейронов и астроцитов, продемонстрировать, что функциональные явления наблюдаемые в экспериментах, коррелируют с структурными изменениями в астроцитах.

Объем проведенных экспериментов, размер выборок достаточен для проведения статистической обработки и анализа данных. Схемы и протоколы экспериментов воспроизводимы. Индексы и параметры (морфологические характеристики астроцитов и их митохондрий), рассчитываемые при анализе данных, однозначно и надежно характеризуют наблюдаемые изменения. Параметрические и непараметрические методы статистического анализа данных экспериментов подобраны корректно. Таким образом, статистическая значимость различий в группах, достоверность результатов и обоснованность выводов исследования не вызывает сомнений.

Оригинальность и состоятельность полученных результатов подтверждается публикациями в рецензируемых высокорейтинговых научных журналах, входящих в базы данных Web of Science и Scopus. Результаты исследования были широко представлены на всероссийских и международных научных конференциях, что, несомненно, позволило ознакомиться с ними научному сообществу и провести их экспертизу.

Основываясь на обширном экспериментальном материале, его анализе и статистической обработке, автор формулирует адекватные выводы.

Замечания и вопросы по диссертации

Критических замечаний к работе нет. Текст диссертации изложен грамотно, понятным языком, несмотря на наличие некоторого количества пунктуационных ошибок и опечаток.

В порядке дискуссии хочу задать следующие вопросы, касающиеся методических подходов и экспериментов, выполненных в диссертации:

1. В диссертации недостаточно детально дано объяснение клеточной избирательной экспрессии векторов на основе аденоассоциированных вирусов. Какие промоторы использованы для избирательной экспрессии AAV в нейронах и астроцитах? Что авторы рассматривали в качестве критерия клеточной избирательности экспрессии генетических конструкций?

2. Как при использовании 532 нм лазера для возбуждения комбинационного рассеяния избегали флюоресценции репортерного белка nirFP?

3. Авторы утверждают, что в работе ими выявлен новый феномен - т.н. «функциональная гиперемия», возникающая *in vivo* в соматосенсорной коре в ответ на локомоторную активность. Признаком функциональной гиперемии является увеличение объёмного кровотока. На основе каких параметров и сигналов автор делает вывод об увлечении объёмного кровотока в ткани?

4. Автором сделано предположение, что заполнение ЭТЦ при повышенной активности, приводит к увеличению продукции АФК астроцитами и способствует увеличению локального кровотока. Автор также предполагает, что в АФК-зависимую вазодилатацию, опосредованную астроцитами, вовлечен оксид азота. Может ли автор сформулировать гипотезу о механизме, связывающем повышение продукции перекиси водорода, наблюдаемой при заполнении ЭТЦ в астроцитах, и вазодилатации за счет NO?

Вышеперечисленные вопросы не влияют на общую положительную оценку диссертационной работы и не ставят под сомнение обоснованность положений и выводов. В целом, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования, выполненного Тяглик Алисой Борисовной.

Заключение

Диссертационное исследование Тяглик А.Б. направлено на исследование закономерностей взаимодействия нейронов, астроцитов, а также элементов системы локальной регуляции кровообращения. Работа Тяглик А.Б. также направлена на изучение механизмов стабилизации метаболической активности нейронов астроцитами; исследование тонкой координации энергетических процессов в нейро-астроцитарной единице, принципов организации астроцитаных субклеточных структуры, их роли в обеспечении функционирования синапсов центральной нервной системы.

Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 1.5.24. Нейробиология (по биологическим наукам), а именно следующим направлениям: среда, окружающая нейроны, нейроглия и межклеточная передача сигналов. а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова. Диссертационное исследование оформлено согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени кандидата наук Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Таким образом, соискатель Тяглик Алиса Борисовна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.24. Нейробиология.

Официальный оппонент:
доктор биологических наук,
профессор кафедры физиологии
человека и животных биологического факультета
Федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего
образования «Московский государственный
университет имени М.В.Ломоносова»,
Кузьмин Владислав Стефанович

5 ноября 2025

Адрес: г. Москва, ул. Ленинские горы 1, стр. 12, индекс 119234.

Телефон:

Эл. почта:

Специальность, по которой защищена диссертация: 1.5.5. Физиология человека и животных.

Адрес места работы:

119234, Москва г, Ленинские Горы ул, 1, стр.12.

Биологический факультет МГУ имени М.В.Ломоносова,

Тел.: e-mail:

Подпись сотрудника В.С. Кузьмина удостоверяю

И.О. Фамилия