

Отзыв

официального оппонента на диссертацию Тихоновой Марии Александровны
«Нейрофизиологические и молекулярно-генетические механизмы
поведенческих нарушений, обусловленных нейродегенеративными
изменениями в головном мозге: экспериментальное исследование»,
представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук
по специальности 03.03.01 – «физиология»

Актуальность темы диссертации

Диссертационное исследование М.А. Тихоновой посвящено актуальной научной проблеме – изучению клеточно-молекулярных механизмов формирования поведения и их нарушений при хронической нейродегенерации. В фокусе исследования – когнитивная и поведенческая дисфункция, развивающаяся при моделировании некоторых нейродегенеративных заболеваний у лабораторных животных (болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, депрессивноподобное состояние). Последние 3 десятилетия ознаменовались в физиологии и нейробиологии значительным интересом к изучению механизмов функционирования головного мозга, лежащих в основе сложных форм поведения, в норме и при патологии. Благодаря современным технологическим решениям удалось получить принципиально новые данные о том, как реализуются когнитивные и поведенческие процессы в здоровом мозге и как нарушаются эти механизмы при хронической нейродегенерации, как эти события связаны с механизмами нейропластичности, секреции нейротрансмиттеров и нейропептидов, изменением экспрессии генов, реорганизацией функциональных связей между различными отделами головного мозга. Известно, что поведенческие расстройства могут выступать в качестве самостоятельного компонента хронической нейродегенерации, иногда - предшествовать ее манифестации и могут требовать отдельной адресной терапии. Однако, несмотря на то, что представления о генезе поведенческих реакций в (пато)физиологических условиях претерпели в последние годы значительные изменения, что позволило по-новому взглянуть на механизмы

развития неврологических дефицитов, по-прежнему остаются не решенными ключевые вопросы: 1) что запускает механизмы нейродегенерации в зрелом головном мозге и как это соотносится с изменения поведенческих реакций? 2) какие молекулы-мишени являются наиболее перспективными для направленного фармакотерапевтического воздействия при коррекции когнитивного дефицита и аберрантного поведения? 3) какие соединения природного и синтетического происхождения могут существенно затормозить или купировать проявления неврологической дисфункции при хронической нейродегенерации? 4) какие экспериментальные модели нейродегенеративных заболеваний на лабораторных животных являются наиболее адекватными и применимыми при изучении (пато)физиологии головного мозга? Диссертация М.А. Тихоновой посвящена поиску ответов на эти вопросы, и поэтому она, несомненно, актуальна и своевременна.

Новизна проведенных исследований и полученных результатов

Автором применены современные модели нейродегенеративных заболеваний на животных (МФТП-индуцированный паркинсонизм, A β 25-35-индуцированная нейродегенерация альцгеймеровского типа, D-галактоза-индуцированное старение, OXYS-генотип с ускоренным старением, ASC/Icg-генотип с признаками депрессии). В основе методологии работы – комплексное нейроповеденческое тестирование животных с указанными моделями нейродегенерации (тест «открытое поле», тест на каталепсию, тест подвешивания за хвост, тест принудительного плавания, тесты, позволяющие оценивать социальные взаимодействия, Т-образный лабиринт, тест на распознавание нового объекта, 5-рукавный лабиринт, тест Барнса, тест формирования условной реакции пассивного избегания), в том числе при применении фармакологических модуляторов и при моделировании острого стресса. Такое широкомасштабное поведенческое фенотипирование животных сопряжено в работе с выполнением молекулярно-генетических

исследований, биохимических исследований, иммуноферментного анализа, клеточно-биологических исследований, гистологического и иммуногистохимического анализа, а также с применением современных методов нейровизуализации (МРТ и фМРТ головного мозга, двухфотонная лазерная микроскопия). Такое сочетание методологических подходов позволило автору получить новые и обладающие несомненной научной значимостью результаты.

Так, М.А. Тихонова впервые убедительно продемонстрировала наличие коррелирующих друг с другом нарушений нейрональных популяций в черной субстанции и гиппокампе при развитии экспериментальной болезни Паркинсона. Ею впервые обнаружены изменения активности амилоид-деградирующих ферментов в головном мозге и аберрантное распознавание обонятельных стимулов у животных с фенотипом ускоренного старения; зарегистрированы гипофизарные и таламические нарушения при развитии депрессивноподобного состояния. Кроме того, автор обнаружил новые аспекты нейропотективной активности антибиотика цефритаксона, реализующего свои эффекты через модуляцию активности реакций аккумуляции $A\beta$ в ткани головного мозга и супрессию нейровоспаления. Впервые показано, что нейротрофический фактор роста BDNF и 8-(трифторметил)-1,2,3,4,5-бензопентатиепин-6-амин обладают антикаталептическим эффектом и могут быть рассмотрены в качестве перспективных соединений с антидепрессантоподобным действием, причем BDNF дополнительно проявляет свое позитивное действие в отношении полового мотивационного поведения.

К наиболее интересным и перспективным для дальнейшего исследования находкам автора следует отнести: 1) обнаружение когнитивной дисфункции (нарушения рабочей памяти и распознавания нового объекта) у животных с экспериментальной болезнью Паркинсона в компенсированную (по моторной дисфункции) стадию развития заболевания, что соответствует снижению плотности нейронов, активации микроглии в

черной субстанции, аберрантной активности нейронных популяций в черной субстанции и в CA1, CA3 регионах гиппокампа; 2) расшифровку новых механизмов нейропротективного действия цефтриаксона, заключающихся в предотвращении гибели нейронов *in vitro* и *in vivo*, что автор связывает с отсутствием влияния на экспрессию глутаматных транспортеров, но наличием влияния на экспрессию фосфорилированных форм Akt-киназы, ERK-киназы на фоне увеличения экспрессии фосфорилированной формы JNK2-киназы в нейронах при окислительном стрессе, а также с влиянием цефтриаксона на экспрессию ферментов, метаболизирующих APP и A β , в частности, в миндалевидном теле и стриатуме головного мозга экспериментальных животных; 3) обнаружение признаков активации нейрогенеза в SGZ гиппокампа у животных с генетически-обусловленным ускоренным старением (крысы линии OXYS); 4) обнаружение синергетических эффектов цефтриаксона и эритропоэтина в контексте коррекции когнитивной дисфункции у животных с нейродегенерацией; 5) обнаружение апрегуляции экспрессии генов Arc и Bdnf в гиппокампе животных с депрессивноподобным фенотипом при центральной инъекции BDNF; 6) получение данных об особенностях экспрессии гена Ace2, кодирующего один из ферментов-участников метаболизма амилоида в головном мозге крыс линии OXYS; 7) регистрацию изменений ольфакторной функции у животных с хронической нейродегенерацией, демонстрирующих нарушение анализа обонятельных стимулов при индуцированном, но не при генетически обусловленном старении.

В целом, научная новизна исследования М.А. Тихоновой заключается в обнаружении новых взаимосвязей ряда клеточно-молекулярных событий и механизмов нейропластичности при формировании сложных форм поведения, а также в научном обосновании возможностей для коррекции когнитивного дефицита и поведенческих расстройств у животных с экспериментальными моделями хронической нейродегенерации. Полученные результаты не только расширяют существующие представления о системных

механизмах реализации когнитивных функций и поведенческих реакций (в т.ч. на уровне функционального сопряжения черной субстанции и гиппокампа, гипофиза и таламуса), но и подтверждают новые и перспективные возможности применения разработанной автором экспериментальной платформы для тестирования нейропротективной активности веществ с использованием комплексного нейробиологического, клеточно-биологического и функционального подхода.

Таким образом, М.А. Тихонова смогла сформулировать и доказать новые представления о механизмах реализации когнитивных функций, сложных форм поведения, а также о возможностях фармакологической коррекции неврологических дефицитов у животных с генетически обусловленной или экспериментально вызванной нейродегенерацией, что подтверждает достижение заявленной цели исследования.

Степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов, рекомендаций и заключений

Достоверность результатов диссертации М.А. Тихоновой подтверждается тем, что автором использованы комплекс современных взаимодополняющих методов исследования (*in vitro*, *in vivo*), широкий спектр экспериментальных моделей заболеваний головного мозга (с достаточным объемом выборки экспериментальных животных), современные методы анализа морфологии и физиологии центральной нервной системы, адекватные поставленным задачам группы контроля и сравнения, применены современные и общепринятые методы статистического анализа полученных данных. Для всех использованных в исследовании соединений с потенциальным нейропротективным эффектом автор обосновал примененные дозы и сроки введения.

Положения, выносимые на защиту, выводы полностью соответствуют полученным результатам, свидетельствуют о достижении цели и решении

всех заявленных в работе задач. Результаты представлены на российских и международных конференциях (в период с 2007 по 2018 годы), в полной мере опубликованы в ведущих российских и международных профильных журналах, в том числе входящих в базы данных Web of Science/Scopus (20 статей).

Значимость результатов, полученных в диссертации, для науки и практики

Значимость полученных результатов диссертационного исследования для науки (физиология, патологическая физиология, нейробиология) определяется тем, что автором обнаружены новые механизмы формирования поведенческих реакций и их нарушений при хронической нейродегенерации при старении, экспериментальной болезни Альцгеймера, экспериментальной болезни Паркинсона, генетически обусловленном депрессивноподобном состоянии; найдены новые молекулярные механизмы реализации нейропротективного и поведение-корригирующего эффектов эндогенных соединений (BDNF, эритропоэтин) и ксенобиотиков (цефтриаксон, ТС-2153) при хронической нейродегенерации.

Значимость полученных результатов для практики (неврология, нейрофармакология) определяется тем, что автором продемонстрирована применимость использованного методологического подхода для комплексной оценки нейропротективной активности соединений; установлены новые молекулы-маркеры реализации их нейропротективного действия и влияния на механизмы нейропластичности, связанные с формированием сложных форм поведения (экспрессия генов немедленного раннего ответа, генов, кодирующих ферменты метаболизма APP и A β , активация ферментов, участвующих во внутриклеточной сигнальной трансдукции), идентифицированы соответствующие различным типам хронической нейродегенерации aberrantные поведенческие фенотипы. Использование современных методов нейровизуализации (в частности, МРТ,

фМРТ) при проведении исследования нейродегенеративных изменений у экспериментальных животных сообщает работе высокую практическую значимость, так как позволяет оптимизировать существующие протоколы оценки состояния регионов мозга и функциональной активности отдельных нейронных популяций в эксперименте и, в перспективе, в клинической практике.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

Результаты диссертационного исследования М.А. Тихоновой могут быть рекомендованы к использованию в следующих областях: 1) физиология, нейробиология, патофизиология, фундаментальная медицина (при планировании и проведении экспериментальных работ, ориентированных на изучение механизмов развития поведенческих реакций и их нарушения у экспериментальных животных, а также при разработке и валидации новых экспериментальных моделей заболеваний головного мозга у лабораторных животных); 2) нейрофармакология (при разработке и оценке биологических эффектов новых препаратов с потенциальной нейропротективной активностью и влиянием на поведение); 3) высшее биологическое и медицинское образование (при обучении по дисциплинам «физиология», «патологическая физиология», «нейробиология»). Эти направления могут быть реализованы в университетах и академических научных центрах Российской Федерации.

Оценивая содержание диссертации в целом, хочу отметить, что она написана в хорошем стиле, читается с интересом, ее автор демонстрирует хорошее владение материалом. Обзор литературы содержит описание и анализ основных аспектов рассматриваемой проблемы, подтверждает то, что автор диссертации свободно ориентируется в различных аспектах

физиологии центральной нервной системы. Несомненным достоинством этого раздела диссертации следует признать подробное описание современных разнообразных подходов к моделированию хронической нейродегенерации на лабораторных животных. Разделы диссертации, в которых описаны материалы и методы, результаты исследования, достаточно детализированы, изложены логично, хорошо структурированы. Обсуждение полученных результатов и заключение по работе удачно завершены интегральной авторской схемой механизмов формирования и коррекции нейродегенеративных нарушений, сопровождающихся когнитивной дисфункцией и поведенческими расстройствами.

В целом, судя по диссертации, автор продемонстрировал себя в качестве сложившегося самостоятельного исследователя, умеющего планировать и выполнять комплексные проекты, систематизировать и критически анализировать полученные экспериментальные данные.

Автореферат отражает содержание диссертации, основные ее разделы и положения, отвечающие паспорту специальности 03.03.01 – «физиология». Оформление диссертации и автореферата соответствует установленным требованиям.

К работе имею **замечания**: 1) в обзоре литературы использованы рисунки других авторов (рис. 1, 2, 4, 5), у рисунка 3 нет ссылки на первоисточник, при этом текст в рисунках не переведен на русский язык, и в этой части работы отсутствуют оригинальные иллюстрации; 2) в главе «Материалы и методы» уместной стала бы сводная таблица анализа и сравнения использованных автором моделей нейродегенеративной патологии для того, чтобы обозначить причины выбора именно этих моделей в исследовании; 3) рисунок 16 мог бы быть выполнен с использованием собственных данных автора; 4) некоторые рисунки в главе, излагающей собственные результаты исследований, выполнены в неудачном масштабе (слишком мелкие изображения результатов блоттинга, иммуногистохимии,

обозначения групп); 5) в заключительной части каждого из разделов главы «Результаты исследования» было бы уместно включить фрагменты авторского текста резюмирующего характера; 6) в тексте диссертации встречаются единичные опечатки и неудачные термины (например, дисморфология). Однако указанные замечания не носят принципиального характера и не влияют на общее положительное впечатление от работы.

Предлагаю автору следующие **вопросы в формате научной дискуссии** по проблематике работы:

1) Почему для анализа эффективности нейрогенеза автором был выбран только один маркер (DCX), который маркирует только «промежуточную стадию» нейрогенеза (между процессами пролиферации и дифференцировки нейральных стволовых и прогениторных клеток и формированием зрелых нейронов)? Как автор может интерпретировать изменение количества DCX-иммунопозитивных клеток у животных линии OXYS?

2) Какое, по мнению автора, значение в формировании аберрантных форм поведения имеет наличие взаимосвязи между снижением плотности нейрональной популяции в черной субстанции и в гиппокампе при экспериментальной болезни Паркинсона, и насколько эти события специфичны по отношению к данному типу хронической нейродегенерации? Регистировал ли автор какие-либо изменения в CA2 регионе гиппокампа, который, по современным представлениям, ответственен за формирование ключевых форм социального поведения?

3) Каков, по мнению автора, терапевтический потенциал применения BDNF в качестве соединения с нейропротективной и поведенчески-корректирующей активностью в реальной клинической практике? Какие ограничения его применения представляются автору наиболее актуальными?

4) С учетом современных данных о роли нейровоспаления в развитии депрессии, предполагает ли автор возможность достижения

антидепрессант-подобного эффекта при применении цефтриаксона в экспериментальной модели депрессии?

Заключение

Диссертация Тихоновой Марии Александровны «Нейрофизиологические и молекулярно-генетические механизмы поведенческих нарушений, обусловленных нейродегенеративными изменениями в головном мозге: экспериментальное исследование» выполнена на высоком научно-исследовательском уровне и представляет собой законченную научно-квалификационную работу, решившую актуальную научную проблему идентификации новых механизмов реализации сложных форм поведения и особенностей их нарушений при развитии хронической нейродегенерации различного генеза для разработки методов коррекции неврологического дефицита, что имеет существенное значение для физиологии. По актуальности темы, степени обоснованности научных положений, сформулированных выводов, достоверности полученных данных, научной новизне, теоретической и практической значимости представленная диссертация полностью соответствует критериям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 г. (в редакции постановления Правительства Российской Федерации № 335 от 21.04.2016 г.), предъявляемым к докторским диссертациям, а ее автор – Тихонова Мария Александровна - заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.03.01 – «физиология»

Официальный оппонент:

главный научный сотрудник и руководитель
НИИ молекулярной медицины и патобиохимии,
заведующая кафедрой биологической химии
с курсом медицинской, фармацевтической
и токсикологической химии,
проректор по инновационному развитию

и международной деятельности
ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого
Минздрава России, доктор медицинских наук,
профессор

Алла Борисовна Салмина

« 30 » октября

2018 г.

Подпись проф. Салминой А.Б. подтверждаю
Начальник Управления кадров ФГБОУ ВО
КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого



Д.В. Челнаков

Салмина Алла Борисовна, д-р мед. наук (14.03.03 – патологическая физиология), профессор по кафедре патологической физиологии с курсом функциональной диагностики, главный научный сотрудник и руководитель НИИ молекулярной медицины и патобиохимии, заведующая кафедрой биологической химии с курсом медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, проректор по инновационному развитию и международной деятельности федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования "Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого" Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России); 660022, Красноярский край, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, дом 1, allasalmina@mail.ru, телефон +7 (391) 228 07 69.