

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора медицинских наук,
профессора РАН

Груздевой Ольги Викторовны
на диссертационную работу

Гориной Яны Валерьевны «Молекулярно-клеточные механизмы ассоциации инсулинорезистентности структур головного мозга с болезнью Альцгеймера (экспериментальное исследование)», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности
3.3.3-патологическая физиология

Актуальность диссертационной работы.

Болезнь Альцгеймера (БА) – медленно прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, которое характеризуется развитием нейропсихиатрических нарушений и значительным угнетением познавательной деятельности, приводя, в конечном итоге, к инвалидности и преждевременной смерти.

Считается, что как генетические, так и негенетические факторы риска играют важную роль в проявлении БА. Ранее начало развития БА являются результатом мутаций в генах APP (белок-предшественник бета-амилоида), PSEN1 (пресенилин 1) и/или PSEN2 (пресенилин 2), тогда как подавляющее большинство случаев позднего возникновения БА являются спорадическими. Самым значимым негенетическим фактором риска является возраст. В возрасте 65 лет вероятность развития БА составляет около 3%, а к 85 годам она возрастает на 30%. Однако и другие факторы риска, такие как сахарный диабет 1 и 2 типа, синдром Дауна, нейровоспаление, вызванное черепно-мозговой травмой, сепсисом и инфекцией, цереброваскулярные и сердечно-сосудистые заболевания, неправильное питание, курение, малоподвижный образ жизни, хронический стресс и воздействие тяжелых металлов способствуют манифестации БА.

Ведущая «амилоидная гипотеза», объясняющая начало и прогрессирование БА, хотя и довольно широко принята, оставляет много вопросов. В частности, остается неясным, «что предшествует запуску образования и аккумуляции токсичной формы бета-амилоида 1-42 (A β 1-42) в спорадических случаях?». Согласно результатам исследований, проведенных за последнее десятилетие, было сформулировано предположение, согласно которого магистральными событиями, которые возникают раньше формирования A β 1-42, являются нарушение синаптической пластичности и структурно-функциональной целостности митохондрий, гибель нейронов и гиперфосфорилирование тау-белка. Стоит отметить, что на сегодняшний день отсутствует достаточно данных для фундаментального и однозначного понимания того, какая совокупность факторов запускает развитие БА, что оставляет вопрос об этиологии заболевания открытым.

Недавние исследования показывают, что нарушение действия инсулина в головном мозге может быть ключевым фактором патогенеза БА, а также

мишенью, воздействуя на которую возможно предотвратить и/или лечить данное заболевание.

Наличие рецепторов инсулина в мозге крыс впервые было продемонстрировано Navrankova J. и соавт. в 1978 г. Немного позже инсулиновые рецепторы были обнаружены и в головном мозге человека. Woods S.C. и его команда были первыми (1978 г), кто провел основополагающие исследования, показавшие, что инсулин действует в мозге, уменьшая потребление пищи. Вскоре было показано, что функция инсулина в ЦНС связана с когнитивными процессами, что позволяет предположить, что действие инсулина в головном мозге также представляет собой нейроэндокринную связь между метаболизмом и когнитивными функциями и может быть подходящей мишенью для лечения как метаболических, так и когнитивных расстройств.

Однако было совсем не ясно, способны ли клетки мозга продуцировать инсулин? Эксперименты на животных демонстрировали, что большая часть инсулина в головном мозге является результатом рецептор-опосредованного транспорта периферического инсулина через гематоэнцефалический барьер. В тоже время, были единичные исследования, свидетельствующие о локальной продукции инсулина в коре головного мозга у животных. Также имеются сообщения о транскрипции инсулина в тканях головного мозга человека. Однако предположение о том, что инсулин в физиологических количествах высвобождается в головном мозге, по-прежнему не имеет убедительных доказательств.

Согласно первым клиническим данным у пациентов с ожирением и/или сахарным диабетом 2 типа, у которых наблюдается различная степень периферической резистентности к инсулину, клетки головного мозга также менее чувствительны к инсулину. Последующие клинические исследования и эксперименты на животных продемонстрировали, что сахарный диабет 2 типа инициирует развитие когнитивной дисфункции, что обусловлено нарушением чувствительности клеток головного мозга к инсулину. Одновременно с этим было установлено, что сахарный диабет 2 типа увеличивает риск развития БА примерно в 2 раза, что объясняется схожими патофизиологическими особенностями – нарушение чувствительности клеток к инсулину, накопление бета-амилоида, гиперфосфорилирование тау-белка, повреждение церебральных сосудов и нейровоспаление, приводящих к повреждению головного мозга.

Дальнейшие исследования показали, что у пациентов с БА снижена периферическая чувствительность к инсулину и выражена гиперинсулинемия как в состоянии натощак, так и в ответ на пероральный тест на толерантность к глюкозе. Учитывая, что хроническая периферическая гиперинсулинемия подавляет экспрессию инсулиновых рецепторов, локализованных в гематоэнцефалическом барьере, и уменьшает количество инсулина, транспортируемого в мозг, периферическая гиперинсулинемия может привести к снижению концентрации инсулина в головном мозге у пациентов с болезнью Альцгеймера. Кроме того, у пациентов с БА наблюдается уменьшение или неправильное расположение (т.е. не расположенных на поверхности мембраны) инсулиновых рецепторов и снижение сродства рецепторов к инсулину в головном мозге.

Однако стоит отметить о существовании неоднозначных данных о том, что инсулинорезистентность головного мозга может развиваться автономно или, возможно, быть следствием периферической инсулинорезистентности. Примечательно, что нарушения периферической передачи сигналов инсулина у лиц с БА были предложены более 25 лет назад. Frazier H.N. и соавторы недавно (2019 г) выдвинули идею о том, что, несмотря на нарушение передачи сигналов инсулина в мозге при БА, сахарном диабете 2 типа и старении, периферическая чувствительность к инсулину может сохраняться в этих условиях. Тем не менее, на сегодняшний момент неясно, может ли резистентность к инсулину развиваться в головном мозге независимо от системной резистентности к инсулину. Остаются также открытыми вопросы, касающиеся участия молекул-компонентов инсулин-сигнального пути в патогенезе заболевания, механизмов, лежащих в основе нарушения передачи сигналов инсулина в нервных клетках, влияния локальной инсулинорезистентности на синаптическую передачу в пораженных областях головного мозга (гиппокамп и миндалевидное тело) и на эффекты А β в эндотелиальных клетках церебральных микрососудов и проницаемость ГЭБ при БА. Это подчеркивает необходимость более глубокого и детального изучения этиологических и патогенетических аспектов болезни Альцгеймера, включая механизмы, лежащие в основе агрегации бета-амилоида, и других сопутствующих факторов (нарушения нейропластичности и развитие церебральной амилоидной ангиопатии), тем самым позволяя определить альтернативные подходы к лечению заболевания.

В этой связи не вызывает сомнения актуальность диссертационной работы Я.В. Гориной, направленной на исследование клеточных и молекулярных механизмов формирования церебральной инсулинорезистентности при БА, ее вклада в развитии нарушений синаптической пластичности, структурно-функциональной целостности гемато-энцефалического барьера, а также когнитивной дисфункции.

Научная новизна.

В диссертационной работе был применен комплексный подход к изучению роли резистентности головного мозга к инсулину в патогенезе нейродегенерации альцгеймеровского типа как с использованием животных моделей (инъекционная и генетическая) заболевания, так и путем моделирования *in vitro*.

Я.В. Гориной впервые продемонстрирован деструктивный потенциал острого токсического действия бета-амилоида в краткосрочном периоде, который выражался в кардинальном изменении инсулин-зависимой регуляции активности ведущих биомолекул инсулин-сигнального пути в нейронах миндалевидного тела головного мозга.

Автором впервые исследовано влияние нарушения активности наиболее значимых компонентов инсулин-сигнального пути – IRS1, протеинкиназы C, GSK-3 β , MAPK и IRAP – на проявлении тревожных форм поведения и дефицита памяти при хроническом накоплении бета-амилоида в генетической модели БА. Это подтверждает выдвинутую гипотезу о критически важном

влиянии бета-амилоид-индуцированной аберрантной инсулин-сигнальной трансдукции, развивающейся в одной из поражаемых нейродегенерацией областей головного мозга – миндалевидном теле, на когнитивные способности и психоэмоциональное состояние.

В рамках инъекционной модели было зарегистрировано глубоко поражающее действие бета-амилоида на регуляцию инсулин-опосредованной синаптической пластичности, что негативно сказывается на функциональной активности нейронов в столь ключевых для формирования познания, эмоций и памяти структурах головного мозга как гиппокамп и миндалевидное тело, что безусловно нашло свое отражение в развитии выраженного когнитивного дефицита и нарушению способности запоминать эмоционально окрашенные ситуации.

Я.В. Гориной впервые зафиксировано поражающее воздействие хронической аккумуляции бета-амилоида на церебральный ангиогенез за счет подавления функциональной активности эндотелия гиппокампа, драматически развивающиеся нарушения церебральной микроциркуляции, сочетанные с выраженной активацией молекул, участвующих в реализации биологических эффектов A β 1-42 таких как белок Fe65 и рецептора конечных продуктов гликирования белков RAGE, что в комплексе провоцирует повышение проницаемости гемато-энцефалического барьера на фоне развития локальной инсулинорезистентности в ткани головного мозга.

Автор впервые продемонстрировал возможность RAGE-опосредованного изменения структурной целостности гемато-энцефалического барьера в условиях острого действия A β 1-42 *in vitro*, что свидетельствует о наличии модулирующего ресурса для таргетного воздействия на активность RAGE для направленной коррекции нарушений гемато-энцефалического барьера.

Содержание и оформление диссертации. Содержание диссертационного исследования Гориной Я.В. изложено на 417 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов собственных исследований, обсуждения полученных результатов, выводов и списка литературы. Библиографический список включает в себя 858 источника, из которых 24 отечественных и 834 иностранных. Работа иллюстрирована 5 таблицами и 69 рисунками.

Во введении обоснована актуальность темы диссертации, сформулированы цель и задачи исследования, положения, выносимые на защиту, научная новизна, а также теоретическая и практическая значимость работы.

Обзор литературы изложен на 73 листах. В данной главе приведен анализ зарубежной и отечественной литературы по теме исследования. Глава состоит из 12 подразделов, в которых представлены данные об особенностях развития нейродегенерации на примере современных моделей болезни Альцгеймера на животных, о роли инсулина в реализации когнитивных функций в норме и при болезни Альцгеймера, рассмотрено представление о церебральной инсулинорезистентности как патогенетическом факторе развития

нейродегенеративных заболеваний и метаболических нарушений, а также проанализированные известные на настоящий момент молекулы-маркеры и молекулы-мишени церебральной инсулинорезистентности. На основании проанализированных данных составлены оригинальные иллюстративные рисунки.

Вторая глава диссертации посвящена описанию материалов и методов исследования. Автором приводится поэтапный дизайн исследования, который включает 10 логично и последовательно выстроенных блоков с включением наглядных и четко выстроенных схем эксперимента, продиктованных сформулированными задачами для решения научной проблемы. Стоит отметить и о развернутом и детальном представлении методики моделирования БА как в условиях *in vivo*, так и в условиях *in vitro*, что позволяет самостоятельно ее воспроизвести стороннему исследователю. Для реализации поставленных задач были активно использованы современные высоко-технологичные методы исследования, такие как иммуногистохимия, иммуноферментный анализ, конфокальная микроскопия, электрофизиологическое исследование, метод полимеразно-цепной реакции в реальном времени. Для оценки изменений когнитивного статуса при развитии БА у животных был использован тщательно подобранный и досконально изложенный комплекс валидированных поведенческих тестов, позволяющий оценить различные аспекты поведения. Не вызывает сомнения и представленная статистическая обработка полученных данных.

Третья глава диссертации посвящена описанию результатов собственных исследований. Автором установлено, что нейродегенерация характеризуется развитием когнитивной дисфункции, различных видов памяти, процессов запоминания, сопряженных с эмоционально окрашенными событиями, что взаимосвязано с патологическим изменением уровня молекул-компонентов инсулин-сигнального пути в гиппокампе и миндалевидном теле. При этом в условиях острого токсического действия бета-амилоида накопление γ H2AX в нейронах провоцирует развитие синаптической дисфункции, которая является одним из возможных факторов ускоренного снижения когнитивных функций. В результате хронического отложения бета-амилоида в ткани головного мозга происходит угнетение ангиогенеза, развитие церебральной амилоидной ангиопатии, что в конечном итоге вызывает повышение проницаемости ГЭБ. Однако блокирование экспрессии RAGE в клетках церебрального эндотелия может нивелировать негативные эффекты бета-амилоида на структурно-функциональную целостность ГЭБ в условиях нейродегенерации.

В четвертой главе диссертационного исследования автор обобщает полученные данные, опираясь на имеющиеся литературные сведения, и делает заключение, согласно которому как острое действие бета-амилоида, так и его хроническая аккумуляция вызывают развитие нарушений передачи сигналов инсулина в гиппокампе и миндалевидном теле головного мозга, что запускает каскад биохимических реакций, активирующих генерацию и накопление бета-амилоида в ткани головного мозга, таким образом замыкая «порочный круг патогенеза».

Выводы, в целом, объективны и соответствуют сформулированным задачам, отражают основные результаты диссертационного исследования, подтверждаются представленными фактическими экспериментальными данными.

Список литературы имеет значительное количество источников за последние 5 лет и характеризует глубокую проработку автором изучаемой проблемы.

В целом, диссертационная работа оформлена соответствии с предъявляемыми требованиями и выполнена на высоком профессиональном уровне.

Степень обоснованности научных положений и выводов, сформулированных в диссертации. Диссертационное исследование выполнено на высоком методологическом уровне с использованием современных высокоинформативных методов исследования (иммуногистохимия, иммуноферментный анализ, электрофизиологическое исследование, ПЦР, различные протоколы получения первичных клеточных культур и культивирования клеток, получение и применение срезов ткани головного мозга, спектрофлуориметрия), сертифицированного оборудования и соответствующей статистической обработки полученных данных. Это в свою очередь определяет достоверность полученных результатов, основанных на согласованности полученных данных. Обоснованность научных положений и выводов, сформулированных Гориной Я.В., определяется постановкой конкретной цели и логически вытекающих из нее задач, четким планированием и последовательным проведением исследований, объемом выборки (количество мышей различных линий равно 200).

По материалам, вошедшим в диссертационную работу, опубликовано 35 публикаций, в том числе, 23 статьи в изданиях рекомендованных ВАК, 11 статей в изданиях, индексируемых в системе цитирования Web of Science и/или Scopus (Q1-Q2) и 1 монография.

Ключевые материалы диссертационного исследования представлены и обсуждены на таких профильных международных и российских научных конференциях, как Типовые патологические процессы: современные тренды в науке (Томск, 2020); Постгеномные технологии: от теории к практике (Воронеж, 2019); Заболевания мозга: вызов XXI века (Казань, 2018); *Frontiers in Metabolism* (Lausanne, 2018); *NeuroFrance 2017* (Bordeaux, France, 2017); *Proceedings 12th Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society* (Göttingen, 2017) и др.

Значимость результатов, полученных автором, для науки и практики. Результаты диссертационного исследования, полученные Гориной Я.В., представляются значимыми с точки зрения новых знаний о молекулярных механизмах поражения гиппокампа и миндалевидного тела при развитии нейродегенерации альцгеймеровского типа, связанных с развитием резистентности ткани головного мозга к инсулину, а также определение степени

участия инсулина в реализации когнитивных функций и эмоциональных аспектов поведения при развитии заболевания. Результаты диссертации могут служить основой для дальнейшего проведения исследований в рамках разработки и валидации методов ранней диагностики заболевания с учетом установленных новых механизмов развития нейродегенерации, ассоциированных с развитием локальной инсулинорезистентности.

Замечания к диссертационной работе.

При знакомстве с диссертационной работой Гориной Я.В. принципиальных замечаний не возникло, но появились вопросы, носящие дискуссионный характер:

1. На каком уровне (пререцепторном (аномальный инсулин), рецепторном (снижение количества или аффинности рецепторов), на уровне транспорта глюкозы или пострецепторном (нарушения передачи сигнала и фосфорилирования) будет проявляться инсулинорезистентность в ткани головного мозга при развитии болезни Альцгеймера?
2. Развитие инсулинорезистентности в ткани головного мозга предшествует генерации и последующему накоплению бета-амилоида или бета-амилоид индуцирует нарушение передачи сигналов инсулина?
3. Церебральная инсулинорезистентность может возникнуть самостоятельно или же является следствием развития периферической инсулинорезистентности ?

Заключение.

Учитывая актуальность темы, научную новизну, теоретическую и практическую значимость полученных результатов считаю, что диссертационная работа Гориной Яны Валерьевны «Молекулярно-клеточные механизмы ассоциации инсулинорезистентности структур головного мозга с болезнью Альцгеймера (экспериментальное исследование)», представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 3.3.3 – патологическая физиология является законченной научно-квалифицированной работой, в которой содержится решение актуальной научной проблемы в области изучения механизмов формирования инсулинорезистентности в ткани головного мозга при БА, и ее роли в развитии нарушений синаптической пластичности, структурно-функциональной целостности гемато-энцефалического барьера, а также когнитивной дисфункции. Диссертационная работа полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора

наук, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 3.3.3 – патологическая физиология.

Официальный оппонент

доктор медицинских наук (специальности 14.03.03 – патологическая физиология, 14.01.05 – кардиология), профессор РАН, заведующая лабораторией исследований гомеостаза федерального государственного бюджетного научного учреждения "Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний"

Груздева Ольга Викторовна

Полное наименование и адрес организации:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний", лаборатория исследования гомеостаза.

Адрес: 650002, Российская Федерация, Кемеровская область, г. Кемерово, Сосновый бульвар, 6,

Телефон: +7 (3842) 643-153, e-mail: kadrnii@kemcardio.ru,

Сайт организации: www.kemcardio.ru.