

## **ОТЗЫВ**

официального оппонента, доктора биологических наук  
Тихоновой Марии Александровны  
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.**

Диссертационное исследование Я.В. Гориной посвящено одной из важных и актуальных проблем современной нейронауки – изучению механизмов патогенеза болезни Альцгеймера, а именно, роли локальной резистентности к инсулину в нейронах и церебральной эндотелии. Болезнь Альцгеймера является наиболее распространенным нейродегенеративным заболеванием, вызывающим деменцию. С увеличением средней продолжительности жизни во всем мире отмечается неуклонный рост числа хронических нейродегенеративных заболеваний, включая болезнь Альцгеймера, что является актуальной медицинской и социальной проблемой, поскольку страдает работоспособное население, увеличивается число инвалидов, возрастают расходы на длительную терапию и реабилитацию больных. Актуальность работы обусловлена необходимостью идентификации новых клеточно-молекулярных механизмов развития болезни Альцгеймера. Несмотря на большой спектр исследований, проводимых в этой области, до сих пор не расшифрованными остаются ключевые звенья патогенеза этого вида хронической нейродегенерации, что затрудняет разработку новых эффективных методов терапии.

Эпидемиологические исследования в совокупности с клиническими исследованиями и исследованиями на моделях *in vivo* и *in vitro* последовательно демонстрируют, что нарушение передачи сигналов инсулина в головном мозге, определяемое как «церебральная резистентность к инсулину», инициирует и ускоряет когнитивную дисфункцию и прогрессирование болезни Альцгеймера, а также может выступать в качестве важного фактора риска развития спорадической формы заболевания. Исходя из имеющихся на сегодняшний момент экспериментальных данных, болезнь Альцгеймера тесно связана с метаболическими нарушениями, поскольку пациенты с сахарным диабетом 1 и 2 типа имеют повышенный риск развития деменции, ровно как и наоборот. В дополнении к этому еще одним важным моментом, связывающим церебральную инсулинорезистентность и риск развития болезни Альцгеймера, является участие инсулина и молекул инсулин-сигнального пути в развитии ключевых невропатологических признаков заболевания – формировании отложений амилоида и нейрофибриллярных клубков.

В связи с этим автор фокусирует свое внимание на изучении клеточных и молекулярных механизмов развития церебральной инсулинорезистентности при экспериментальной болезни Альцгеймера, ведь в передаче сигналов инсулина участвуют различные молекулы, и нарушение сбалансированной работы молекул-компонентов инсулин-сигнального пути может привести к патологическим изменениям в передаче сигналов инсулина, тем самым способствуя развитию симптомов болезни Альцгеймера. Более того, рассматривается влияние aberrантной инсулин-сигнальной трансдукции на развитие синпатической дисфункции в гиппокампе и миндалевидном теле головного мозга, а также запуск патологических структурно-функциональных изменений церебральных микрососудов, что приводит к развитию амилоидной ангиопатии.

В этой связи, диссертационная работа Я.В. Гориной, несомненно, актуальна и практически значима.

**Новизна исследования.** Я.В. Горина в своем диссертационном исследовании детально изучила механизмы формирования локальной инсулинорезистентности в ткани головного мозга при экспериментальной болезни Альцгеймера в контексте нарушения активности ключевых молекул-компонентов инсулин-опосредованного сигнального пути и их участия в реализации aberrантной нейропластичности, развитии церебральных сосудистых нарушений и когнитивной дисфункции.

Следующие положения имеют приоритетную новизну:

1. Автором получены новые данные о развитии локальной инсулинорезистентности в миндалевидном теле, спровоцированном хронической аккумуляцией бета-амилоида.

2. Соискателем определена ключевая роль подострого токсического действия бета-амилоида в изменении экспрессии таких важных молекул-компонентов инсулин-опосредованного сигнального пути, как инсулиновый рецептор (IR), субстрат инсулинового рецептора 1 (IRS1), протеинкиназа C, гликогенсинтаза киназа-3-бета (GSK-3beta), митоген-активированная протеинкиназа (МАРК) и инсулин-регулируемая аминопептидаза (IRAP).

3. Автором получены новые данные о биологических эффектах инсулина в гиппокампе и миндалевидном теле головного мозга на фоне подострого токсического действия бета-амилоида, а именно, выраженном снижении степени влияния инсулина на синаптическую передачу, о чем указывают зарегистрированные изменения базового электрофизиологического показателя, амплитуды полевых возбуждающих постсинаптических потенциалов как показателя возбудимости нервных клеток.

4. Соискателем получены новые данные о механизмах развития амилоидной ангиопатии вследствие хронического накопления бета-амилоида. В частности, в рамках генетической модели заболевания зафиксировано нарушение церебрального ангиогенеза из-за подавления функциональной активности клеток эндотелия церебральных микрососудов,

выраженные церебральные микрососудистые нарушения. Указанные патологические изменения сопряжены с активацией молекул, участвующих в реализации биологических эффектов бета-амилоида – белка Fe65 и рецептора конечных продуктов гликирования белков RAGE, что в целом приводит к повышению проницаемости гемато-энцефалического барьера на фоне развития локальной инсулинорезистентности в ткани головного мозга.

5. Автором продемонстрирована возможность модуляции активности RAGE в клетках церебрального эндотелия с целью направленного нивелирования патологических нарушений проницаемости гемато-энцефалического барьера при нейродегенерации, ассоциированной с развитием церебральной инсулинорезистентности.

**Содержание и оформление диссертации.** Диссертационная работа Я.В. Гориной построена по традиционному плану, и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов собственных исследований, обсуждения полученных результатов, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 417 страницах машинописного текста, иллюстрирована 5 таблицами и 69 оригинальными рисунками.

Введение включает исчерпывающие сведения актуальности выполняемой работы, показана степень научной разработанности проблемы, определена цель и сформулированы логически выстроенные задачи исследования, определена научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, положения, выносимые на защиту.

В обзоре литературы в полной мере суммированы данные как отечественной, так и зарубежной литературы по теме исследования. Обзор литературы представляет собой последовательно и четко изложенный раздел диссертации, в котором представлены современные данные о церебральной инсулинорезистентности как патогенетическом факторе развития нейродегенеративных заболеваний и метаболических нарушений, представлены данные о молекулах-компонентах инсулин-сигнального пути, их функциях и значимости изменения их активности в патогенезе болезни Альцгеймера, подробно дана информация о потенциальных молекулах-маркерах и молекулах-мишенях локальной инсулинорезистентности. Представленный обзор свидетельствует о хорошем знании автором современных данных по исследуемой проблеме.

Во второй главе автором представлены материалы и методы. Работа выполнена на лабораторных мышах различных линий (линии CD1, C57BL/6, 5xFAD). Для моделирования болезни Альцгеймера автор использует интрагиппокампальное введение бета-амилоида с использованием стереотаксической установки, генетическую модель (линия 5xFAD) и моделирование заболевания *in vitro*. В качестве методов лабораторного исследования автором использованы иммуногистохимическое исследование, иммуноферментный анализ, батарея нейроповеденческих тестов, ПЦР-анализ, электрофизиологическое исследование. Автором представлен поэтапный дизайн с последовательным представлением схем по каждому

блоку исследовательской работы, описаны и обоснованы методы статистической обработки.

Третья глава диссертации посвящена описанию собственных результатов исследования, четвертая глава обобщает полученные результаты на основании имеющихся литературных данных.

Выводы отражают основные результаты диссертационной работы. Список литературы включает 858 источника, в том числе 24 отечественных и 834 иностранных.

Таким образом, диссертационная работа выполнена и оформлена согласно требованиям, предъявляемым к диссертационным работам. Автореферат соответствует тексту диссертации, публикации автора полно отражают основное содержание работы.

**Степень обоснованности научных положений и выводов, сформулированных в диссертации.** Достоверность полученных результатов основана на достаточном по объему и репрезентативности экспериментальном материале, обеспечена соответствующим дизайном исследования, включающим несколько валидных моделей болезни Альцгеймера *in vivo* и *in vitro*, обоснованном формировании групп сравнения, грамотным использованием современных молекулярно-генетических подходов (иммуногистохимия, конфокальная микроскопия, ИФА, электрофизиологическое исследование, ПЦР). В работе применены адекватные методы статистической обработки.

Сделанные автором выводы обоснованы и соответствуют поставленным задачам. Выводы и выносимые на защиту положения основаны на полученных результатах. Новизна результатов, основных положений и выводов, сформулированных в диссертации, не вызывают сомнений.

Материалы диссертационного исследования в необходимом объеме представлены в публикациях. Результаты, полученные в ходе работы, опубликованы в 35 печатных работах, в том числе в 23 статьях из перечня журналов, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки РФ для публикации материалов диссертации на соискание ученой степени доктора наук и в 11 статьях в журналах международных баз данных Web of Science, Scopus. Кроме того, автор представил основные результаты и положения диссертационного исследования на профильных общероссийских и международных конференциях.

**Значимость результатов, полученных автором, для науки и практики.** Работа имеет значение для фундаментальной науки в области исследования патологических механизмов нейродегенерации. Гориной Я.В. сформулированы выводы и положения, которые вносят существенный вклад в понимание особенностей развития локальной инсулинорезистентности, роли молекул-компонентов инсулин-сигнального пути в развитии aberrантной инсулин-сигнализации, о ее влиянии на развитие церебральных

микрососудистых нарушений, а также синаптическую передачу нервного импульса в гиппокампе и миндалевидном теле при нейродегенерации по типу болезни Альцгеймера. Полученные результаты дополняют имеющиеся знания о клеточно-молекулярном механизме развития церебральной инсулинорезистентности в ткани головного мозга при экспериментальной болезни Альцгеймера. Понимание механизмов формирования патологии сделает возможным разработку более эффективных стратегий лечения.

Полученные результаты могут быть учтены в процессе разработки новых способов патогенетической терапии болезни Альцгеймера в академических научных учреждениях биомедицинского профиля. Разработанные *in vitro* модели можно рекомендовать для проведения фундаментальных исследований в этой области и первичного скрининга лекарственных средств. Теоретические положения исследования могут быть использованы в курсах лекций и учебных пособиях для студентов биологических и медицинских факультетов ВУЗов.

**Замечания и вопросы по диссертации.** Существенных замечаний к оформлению работы и изложению результатов нет. Однако в ходе прочтения диссертации возникли следующие *замечания*:

1) В диссертации неверно указан метод статистического обсчета ряда данных как непараметрический дисперсионный анализ (критерий Краскелла-Уоллиса). Критерий Краскела-Уоллиса - это непараметрическая альтернатива одномерному (межгрупповому) дисперсионному анализу, в то время как в тексте приводятся значения F-критерия (критерия Фишера для параметрического дисперсионного анализа), а не рангового H-критерия, и для нескольких факторов и их взаимодействия. Интерпретация критерия Краскела-Уоллиса в основном сходна с параметрическим одномерным дисперсионным анализом, за исключением того, что этот критерий основан скорее на рангах, чем на средних (Siegel & Castellan, 1988).

2) Описание методов в ряде случаев является не полным, упущены важные детали, которые могут существенно повлиять на результаты и их интерпретацию. В частности, для ПЦР анализа не приведены последовательности использованных праймеров и не указан метод обсчета данных. Для поведенческих тестов не указаны условия освещения – так, светлая камера в тесте черно-белой камеры должна быть ярко освещена, а приподнятый крестообразный лабиринт проводят, наоборот, при приглушенном свете; тесты на социальное поведение и когнитивные функции – при приглушенном свете или красном свете. Не приведены формулы расчета индексов в тесте распознавания нового объекта. Не указан возраст животных трансгенной модели в экспериментах, где проводили ИГХ анализ.

3) Неверно обозначен поведенческий тест светло-темной камеры как черно-белая камера, хотя животное помещали в начале теста в светлый отсек. Поскольку основным показателем тревожности в данном тесте считается уменьшение времени, проведенного в светлом отсеке, то сложно согласиться

с интерпретацией соискателя об усилении тревожности трансгенных мышей, у которых увеличено время пребывания в светлом отсеке. По-видимому, как и в случае с приподнятым крестообразным лабиринтом, трансгенные мыши характеризуются увеличением времени замирания. Вероятно, стоило провести тест черно-белой камеры, помещая мышей изначально в темный отсек, для корректной интерпретации данных. Также желательно проводить тест открытого поля для корректной оценки общей двигательной и исследовательской активности животных, которые могут оказать влияние на поведение в других тестах.

4) В целом, не совсем понятно включение результатов поведенческого тестирования в работу. Используемые в работе модели широко исследуются в мире, в т.ч. когнитивные нарушения и аффективные отклонения были ранее исследованы и в рамках трансгенных, и инъекционных моделей болезни Альцгеймера. Соотнесение поведенческих изменений с метаболическими нарушениями посредством, например, корреляционного анализа не проведено. Аналогично, связь накопления фосфорилированной формы гистона  $\gamma$ H2AX с инсулинорезистентностью следует обосновывать не только и не столько межгрупповыми различиями между контрольными мышами и мышами с альцгеймероподобной патологией, но выявлением корреляций с метаболическими нарушениями или модуляцией показателя под действием определенных метаболических изменений.

5) Выбранный метод исследования экспрессии белков (ИГХ анализ, оценка числа маркер-позитивных клеток в нескольких полях зрения) не представляется оптимальным, т.к., во-первых, экспрессия носит, скорее, аналоговый, нежели дискретный характер, во-вторых, для оценки роли киназ (МАРК, РСК, GSK-3 $\beta$  и пр.) важна их активность, нежели количество молекул, что оценивают, например, по соотношению фосфорилированных и не фосфорилированных форм. Предпочтительным методом является Вестерн-блоттинг. Ряд рисунков с ИГХ иллюстрациями (Рис. 34, 36, 61) представлены в низком разрешении.

**Вопросы:**

1) У мышей с инъекционной моделью болезни Альцгеймера выявлено повышение уровня мРНК инсулина, но не белка. Как это можно объяснить? Как ведут себя эти показатели в рамках других моделей болезни Альцгеймера?

2) Какие молекулы-мишени считаются наиболее перспективными в плане коррекции инсулинорезистентности в мозге? Что можно сказать в этом отношении о глюкагоноподобном пептиде-1 и его миметиках?

**Заключение.** Высказанные замечания и вопросы носят дискуссионный характер и не снижают ценности исследования. Диссертационная работа Яны Валерьевны Гориной «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 на основании выполненных автором исследований разработаны теоретические положения о механизмах патогенеза болезни Альцгеймера, их совокупность можно квалифицировать как новое научное достижение, имеющее важное значение для развития патологической физиологии мозга.

По актуальности, научной новизне, методическому уровню, теоретической и практической значимости, обоснованности научных положений и выводов, полноте изложения материалов работы в печатных изданиях диссертационная работа Яны Валерьевны Гориной соответствует требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» (постановление Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842, в редакции постановления Правительства Российской Федерации от 01.10.2018 г. с изменениями от 26.05.2020 г.), 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.

д.б.н.

Мария Александровна Тихонова

Главный научный сотрудник с и.о. заведующей лабораторией экспериментальных моделей нейродегенеративных процессов  
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение “Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины” (НИИНМ)  
630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 4,  
Телефон (383) 373-01-87  
Факс (383) 335-97-54  
e-mail: tikhonovama@neuronm.ru