

## Отзыв

официального оппонента Гривенникова Игоря Анатольевича на диссертационную работу Попугаевой Елены Александровны «Фармакологическая коррекция кальциевой дисрегуляции в нейронах гиппокампа – новый подход к лечению болезни Альцгеймера» представленной на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальностям 14.03.06 - фармакология, клиническая фармакология, 03.03.01 - физиология

### Актуальность темы

Болезнь Альцгеймера (БА) представляет собой самое распространенное в настоящее время нейродегенеративное заболевание, поражающее в первую очередь участки мозга ответственные за когнитивные функции, а именно гиппокамп и кору. Увеличение продолжительности жизни населения и нарастание стрессогенного давления современной цивилизации на конкретного человека повышает риск возникновения нейродегенеративных заболеваний, в частности БА. Существующие в настоящее время средства фармакотерапии БА не достаточно эффективны и не приводят к излечению. Поэтому актуальным остается поиск новых молекулярных мишеней и регулирующих их соединений – потенциальных фармакологических средств лечения БА.

Отличительной чертой патогенеза БА является медленно прогрессирующее снижение когнитивных функций. Предполагается, что память на клеточном уровне хранится в синапсах, образуемых аксонами и дендритными шипиками. Утрата синаптических контактов между нейронами в гиппокампе и коре головного мозга пациентов коррелирует со степенью тяжести деменции. Предполагается, что блокирование или ограничение синаптической утраты в мозге пациентов будет иметь терапевтический эффект. Набор синаптопротекторных соединений на текущий момент ограничен, и представлен в основном соединениями, прицельно воздействующими на различные субъединицы NMDA- рецепторов. Поэтому

поиск и разработка фармакотерапии, нацеленной на предотвращение или ограничение утраты синаптических контактов, являются актуальными и перспективными направлениями современной нейрофармакологии.

Стабильность и морфология дендритных шипиков зависит от активности ионных каналов, осуществляющих регуляцию внутриклеточной концентрации кальция. Хорошо изученными ионными каналами в физиологии дендритных шипиков являются NMDAR, AMPAR и VGCC, которые являются мощными кальций проницаемыми ионными каналами плазматической мембраны. Однако роль кальциевых каналов, в частности TRPC6 (семейство каналов с транзиторным рецепторным потенциалом), осуществляющих тонкую регуляцию внутриклеточной концентрации кальция в поддержании стабильности и морфологии дендритных шипиков изучена недостаточно. В этой связи диссертационная работа Попугаевой Елены Александровны посвящена актуальной теме – поиску фармакологических соединений прицельно воздействующих на кальций-проницаемые ионные каналы, осуществляющих тонкую регуляцию уровней кальция в нейронах и ограничивающих синаптическую утрату в нейронах гиппокампа на примере мышей с моделями БА.

#### **Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации**

В диссертационной работе Попугаевой Е.А. использован комплексный подход для решения поставленных научных задач: молекулярный уровень (*in vitro*) – доказательство того, что белки STIM2 и TRPC6 в составе деполуправляемых кальциевых каналов участвуют в поддержании морфологии дендритных шипиков в нескольких моделях БА у мышей; клеточный уровень (*in vitro*) – воздействие ряда фармакологических соединений на каналы TRPC6 способно ограничить синаптическую утрату у мышей с экспериментальной БА; срезы мозга трансгенных мышей (*ex vivo*) – доказательство нейропротекторного эффекта соединения лидера,

проявляющегося в восстановлении индукции долговременной потенциации; исследование влияния исследуемого соединения на поведение мышей (*in vivo*) – доказательство того, что положительные модуляторы TRPC6 могут восстанавливать кратковременную память у животных на модели экспериментальной ишемии. Следует отметить, что все эксперименты с лабораторными животными выполнены при соблюдении положений современной биоэтики.

Исследование структурировано логично: каждый последующий эксперимент определен предыдущим, организуя цепь логических рассуждений, выдвигаемых гипотез и обосновывая полученные результаты и выводы.

В диссертационной работе использован широкий спектр современных методов исследований: генетические, молекулярно-биологические, клеточная инженерия, биоинформатический поиск потенциальных фармакологических препаратов, двухфотонная и конфокальная микроскопия, а также электрофизиологические и поведенческие методы. Полученные результаты проанализированы надежными статистическими методами. Положения, выносимые на защиту, и выводы соответствуют поставленным цели и задачам.

Основные научные результаты опубликованы в ведущих научных журналах, рекомендованных ВАК.

### **Теоретическая и научно-практическая значимость работы**

Диссертационное исследование Попугаевой Е.А. вносит весомый вклад в понимание молекулярных механизмов кальций-зависимых путей дестабилизации постсинаптических частей синаптических контактов – дендритных шипиков. Попугаевой Е.А. разработана *in vitro* модель амилоидной синаптотоксичности, которая может быть использована в качестве тест-системы для исследования синаптопротекторных свойств потенциальных лекарственных препаратов. Практически значимым является

рассматривание кальций проницаемых ионных каналов TRPC6 в качестве молекулярной мишени для поиска и разработки специфичных фармакологических препаратов. В процессе выполнения исследования определены базовые химические структуры, модулирующие активность TRPC6 в мышцах с моделями БА, которые могут быть далее использованы для разработки эффективной лекарственной терапии этого заболевания.

**Теоретические положения, совокупность которых можно квалифицировать как новое крупное научное достижение в развитии нейрофармакологии и нейрофизиологии.**

Положение 1, построенное на основании результатов, представленных в диссертации на стр.71-85, дополняет существующие знания о молекулярных механизмах кальций зависимой дестабилизации синаптических контактов в условиях амилоидной токсичности *in vitro* и *in vivo*.

Положение 2, обоснованное результатами, приведенными на рис. 14, 16 и 39, 40, 41 доказывает необходимость сохранения физиологической активности каналов TRPC6 для поддержания внутриклеточного кальциевого гомеостаза. Доказано, что при гипоактивности и гиперактивности кальциевых каналов снижается количество синаптических контактов в гиппокампе.

Положение 3, сформулированное о новой стратегии разработки средств лекарственной терапии различных форм БА, обусловленных нарушением  $Ca^{2+}$ -зависимых сигнальных путей, подтверждается наличием терапевтического эффекта, а именно, снижением числа амилоидных бляшек в коре головного мозга, у мышей с моделью БА вследствие активации кальций зависимого сигнального пути, а также в восстановлении краткосрочной пространственной памяти у крыс с моделью ишемии головного мозга при однократном введении фармакологического препарата, модулирующего активность TRPC6 каналов в нейронах гиппокампа.

Положение 4, сформулированное на основании результатов диссертации стр. 93-100, определяет новую молекулярную фармакологическую мишень – каналы TRPC6 в составе депо-управляемых кальциевых каналов в гиппокампе нейронов для разработки средств лечения БА.

Положение 5, построенное на основании результатов, приведенных в диссертации на рис. 26,27,35,36,37,41,42 представляет различные классы химических соединений, выступающих в качестве модуляторов каналов TRPC6, перспективных для разработки селективных фармакологических препаратов.

Положение 6, сформулированное на основании всех результатов работы и является итоговым положением, указывающим на необходимость разработки персонализированной лекарственной терапии БА, на основе как агонистов, так и антагонистов депо-управляемых кальциевых каналов, в зависимости от формы БА.

#### **Содержание диссертации, ее завершенность.**

Диссертация оформлена по традиционной схеме с соблюдением требований ГОСТ. Диссертация включает в себя: введение, объекты и методы исследования, результаты исследований, обсуждение результатов, заключение, выводы, практические рекомендации, список литературы. Диссертация изложена на 168 страницах, содержит 5 таблиц и 41 рисунок. Список литературы охватывает как отечественные, так и зарубежные источники, в целом 297 источника.

**Во введении** описаны актуальность темы исследования, научная новизна, четко сформулированы цель, задачи исследования и положения, выносимые на защиту.

**Обзор литературы** посвящен описанию кальциевой гипотезы БА. Приведено описание нарушений кальциевой регуляции в мышечных моделях с амилоидной токсичностью, а также в моделях без амилоидной токсичности. Подробно описана существующая и разрабатываемые фармакотерапии БА на

основе модуляторов NMDAR и VGCC. Также в обзоре литературы рассматриваются уже известные модуляторы TRPC6 каналов и их преимущества и недостатки.

**В главе 2 «Объекты и методы исследования»** достаточно подробно описаны химические соединения, векторные конструкции, аденоассоциированные вирусы, трансгенные мыши, дано подробное описание используемых методик, приведены адекватные методы статистики. В целом содержание этой главы свидетельствует о экспериментально-методическом опыте автора.

**В главе 3 «Результаты исследований»** приведено описание экспериментальных данных с указанием числа  $n$  и уровня статистической значимости, результаты представлены в виде графиков, гистограмм и репрезентативных микрофотографий, приведены масштабные метки. Глава содержит 5 разделов.

**В главе 4 «Обсуждение результатов»**, состоящей из 4-х разделов, приведено корректное сравнение полученных экспериментальных данных с данными литературы, сделанные выводы обоснованы и аргументированы.

**Выводы диссертации** последовательны, подтверждены экспериментальными данными и соответствуют основной цели и задачам исследования.

Приведённые практические рекомендации указывают на реальное применение результатов диссертационного исследования не только в фундаментальной науке, но и в практической медицине.

Основные положения и результаты диссертационного исследования были неоднократно доложены на научно-практических конференциях.

Диссертационная работа Попугаевой Е.А. представляет собой завершённое научное исследование, имеющее фундаментальный и прикладной характер. Оформление диссертации соответствует требованиям «Положения о присуждении ученых степеней».

## **Автореферат**

Основные положения автореферата полностью соответствуют разделам и содержанию диссертационной работы. Замечаний к автореферату не имеется.

### **Полнота публикаций результатов диссертационного исследования**

Результаты работы опубликованы в 14 статьях, входящих в международные базы цитирования (WoS и Scopus), 4 статьях в журналах, входящих в РИНЦ, 1 главе в монографии. Получен 1 патент. Результаты диссертационной работы были представлены на 14 Российских и международных конференциях.

**Замечания и вопросы.** Принципиальных замечаний по структуре диссертации, использованным материалам и методам, изложению полученных результатов и содержанию работы не имеется. Встречаются стилистические неточности, которые не снижают достоинств работы и общего положительного впечатления от нее, а также ценности полученных результатов.

В ходе научной дискуссии хотелось бы задать автору следующие вопросы:

1. Пиперазины широко используются в современной медицине для лечения, в том числе шизофрении и других неврологических расстройств. Имеются ли на фармацевтическом рынке производные пиперазинов, которые воздействуют на молекулярную мишень – каналы TRPC6? Возможно ли их применения для лечения БА?
2. На взгляд диссертанта, если удастся разработать лекарственный препарат, селективно действующий на TRPC6 каналы, сможет ли он навсегда излечить пациентов с БА, в частности в случаях болезни с мутациями в определенных генах (например гены пресенилинов)?

## Заключение

Диссертационное исследование Попугаевой Елены Александровны «Фармакологическая коррекция кальциевой дисрегуляции в нейронах гиппокампа – новый подход к лечению болезни Альцгеймера» выполнено на высоком научно-экспериментальном уровне и представляет собой законченную научно-квалификационную работу, в которой разработаны теоретические положения, совокупность которых можно квалифицировать как новое крупное научное достижение в развитии фармакологии, физиологии и медико-биологической науки в целом. Работа полностью удовлетворяет всем требованиям «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09. 2013 г. № 842, предъявляемым к докторским диссертациям, а ее автор Попугаева Елена Александровна заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальностям 14.03.06- фармакология, клиническая фармакология, 03.03.01- физиология.

Официальный оппонент

доктор биологических наук, профессор,  
главный научный сотрудник Лаборатории молекулярной  
нейрогенетики и врожденного иммунитета  
НИЦ «Курчатовский институт» - ИМГ

Гривенников Игорь Анатольевич

г. Москва, 123182, пл. академика Курчатова д.2, Федеральное государственное бюджетное учреждение Институт молекулярной генетики Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» (НИЦ «Курчатовский институт» - ИМГ), тел.: 8499-1960014, e-mail: igorag@img.ras.ru

Подпись Гривенникова И.А. заверено,  
заместитель Директора  
НИЦ «Курчатовский институт» - ИМГ  
доктор биологических наук, профессор



П.А. Сломинский

«21» сентября 2021 г.