

УТВЕРЖДАЮ

директор ФГБУН Института физиологии

им. И. П. Павлова РАН,

академик РАН, д.б.н. Л.П. Филаретова



« 1 » июля 2021 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт физиологии им. И.П. Павлова» РАН о научно-практической ценности диссертации 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 выполненной работы и ее связь с соответствующими отраслями науки. В современном мире болезнь Альцгеймера (БА) является преобладающей формой старческой деменции, для возникновения которой основным фактором риска является преклонный возраст. В настоящий момент не существует эффективной лекарственной терапии БА. На фармацевтическом рынке присутствуют препараты - блокаторы холинэстеразы и NMDA-рецепторов, которые лишь временно снижают выраженность симптомов заболевания, но существенно замедлить прогрессирование БА не способны.

Отличительной чертой БА является ее медленное развитие, связанное с потерей сначала краткосрочной и позднее долгосрочной памяти. Общепринято, что память формируется за счет образования эффективной синаптической передачи между дендритным шипиком и постсинаптическим нейроном. Влияние на эти синаптические процессы способно остановить потерю памяти на модельных животных с БА. Поиск фармакологических средств, модулирующих синаптические процессы, является актуальным направлением современной нейрофармакологии.

Разрабатываемая гипотеза диссертации Попугаевой Е.А. заключается в том, что фармакологическая коррекция тонкой кальциевой дисрегуляции в дендритных шипиках способна предотвратить синаптические нарушения в нейронах гиппокампа на ранних стадиях БА. Исследуемые Попугаевой Е.А. фармакологические агенты

воздействуют на новую молекулярную мишень - кальций пропускающий канонический канал с транзиторным рецепторным потенциалом бго типа (TRPC6). Диссертационная работа Попугаевой Е.А. представляет собой фундаментальное исследование, направленное на решение важнейших физиологических, фармакологических и практических задач. Она открывает путь для поиска и разработки новых фармакологических препаратов для лечения БА, что делает диссертационное исследование Попугаевой Е.А. актуальным и практически значимым. Отметим, что результаты, представленные в диссертации Попугаевой Е.А., соответствуют высокому мировому уровню научных исследований, они опубликованы в ведущих научных журналах.

Актуальность темы исследований не вызывает сомнений. На это указывает тот факт, что работа выполнена при финансовой поддержке различных научных фондов России (РНФ, РФФИ, гранты Президента РФ, Госзадание, Мегагрант, фонд Династия).

Обоснованность основных научных положений, выводов и практических рекомендаций. Целью исследования диссертанта было выявление фармакологических мишеней и регулирующих их химических агентов, перспективных для фармакологической разработки средств лечения болезни Альцгеймера, на основе анализа кальций зависимых процессов, включенных в патогенез заболевания. В соответствии с поставленной целью сформулировано восемь конкретных задач. Для их решения Попугаева Е.А. использовала широкий набор самых современных методов исследований. Четко прослеживается логика исследований – молекулярный и клеточный уровни, изучение срезов мозга модельных животных, системные эксперименты. При этом на каждом этапе исследований применены новейшие технологии такие как конфокальная лазерная и двухфотонная микроскопия нервных клеток, визуализация кальциевых осцилляций в постсинаптических структурах синаптических контактов, электрофизиологический метод регистрации долговременной потенциации, оценка влияния фармакологических соединений на краткосрочную и долгосрочную память с использованием поведенческих экспериментов. Характер и количество полученного научного материала адекватны задачам диссертации. Объем

экспериментальных данных, их статистическая обработка и высокий уровень международных публикаций позволяют считать результаты диссертационной работы достоверными, а положения и выводы - обоснованными.

В ходе исследования диссертант сделала ряд важных находок. В частности, нарушение формирования устойчивых синаптических контактов может быть выделено в качестве перспективного для фармакологической коррекции основного патогенетического звена заболевания. Автором показано, что в условиях амилоидной токсичности нарушается регуляция кальциевой сигнализации, происходит потеря синаптических контактов, а положительная модуляция TRPC6-каналов в составе депо-управляемых кальциевых каналов обеспечивает защиту нейронов гиппокампа. Диссертант охарактеризовала базовые структуры химических агентов, модулирующих активность каналов TRPC6 в нейронах гиппокампа. Эти субстанции могут оказаться перспективными для дальнейших фармакологических исследований, направленных на создание лекарственных препаратов для лечения БА.

Результаты исследований репрезентативны, не вызывает сомнений их надежность. Диссертантом представлен большой объем экспериментальных данных, их корректная статистическая обработка, четкое представление в виде рисунков, таблиц и пояснений к ним позволяет квалифицировать результаты диссертационной работы как достоверные, а основные положения, выносимые на защиту, выводы и практические рекомендации как обоснованные.

Научная новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. Диссертантом предложен новый способ коррекции синаптической утраты в нейронах гиппокампа - восстановление тонкой регуляции кальция в постсинаптических частях синаптических контактов на ранних стадиях болезни Альцгеймера. Автор работы определила структуры химических агентов, модулирующих активность новой молекулярной мишени - каналов TRPC6 в составе депо-управляемых кальциевых каналов нейронов гиппокампа. Попугаева Е.А. впервые доказала их нейропротекторную эффективность на экспериментальных трансляционных моделях болезни Альцгеймера. Диссертантом разработана *in vitro* модель низкой

амилоидной синаптотоксичности, имитирующей начальную стадию БА. Важно отметить, что обнаруженные соединения для фармакотерапии БА воздействуют на новую фармакологическую мишень – каналы TRPC6 в нейронах гиппокампа, активируемые по депо-зависимому пути. Рецензируемая работа может быть квалифицирована как новое исследование в области молекулярной фармакологии и нейрофизиологии.

Значимость для науки и практической деятельности полученных соискателем результатов. Диссертационное исследование Попугаевой Е.А. является значимым для науки, так как демонстрирует, что изменения кальций-зависимых сигнальных путей TRPC6-зависимого нейронального депо-управляемого входа кальция лежат в основе дестабилизации синаптических контактов. Попугаевой Е.А. доказано, что тонкая регулировка кальциевой сигнализации в дендритных грибовидных шипиках позволяет ограничить развитие амилоидной токсичности и восстановить синаптическую пластичность в срезах мозга трансгенных мышей - моделей БА. Практическая значимость диссертационного исследования заключается в том, что Попугаева Е.А. предлагает разработку и поиск новых фармакологических препаратов, отталкиваясь от молекулярной мишени - каналы TRPC6. Кроме того, Попугаевой Е.А. показано, что при изыскании фармакологических средств лечения болезни Альцгеймера, вызванной нарушением Ca^{2+} зависимого пути, фармакотерапевтические свойства могут быть выявлены как у агонистов, так и антагонистов депо-управляемых кальциевых каналов.

Сформулированная Попугаевой Е.А. стратегия фармакологической коррекции кальциевой дисрегуляции в нейронах гиппокампа является совершенно новой, что открывает перспективы разработки эффективных лекарственных средств для терапии болезни Альцгеймера.

Структура и содержание работы. Диссертационная работа Попугаевой Е.А. изложена на 168 страницах машинописи, иллюстрирована 43 рисунками и 5 таблицами. Построение диссертации стандартное и соответствует ГОСТу РФ. Список литературы содержит 297 ссылок (6 отечественных и 291 зарубежных) на

работы, опубликованные в основном за последние 15 лет. Диссертация написана хорошим научным языком, читается легко.

В обзоре литературы (глава 1) представлены в основном данные зарубежных литературных источников, раскрывающих механизмы кальциевой дисрегуляции в патогенезе болезни Альцгеймера, существующие фармакологические подходы для лечения болезни Альцгеймера их недостатки, отдельное внимание уделено описанию механизмов тонкой кальциевой дисрегуляции в нейронах гиппокампа способам их коррекции.

В объектах и методах (глава 2) исследования описаны клеточные и системные модели болезни Альцгеймера, среди которых трансгенные линии мышей. Описана методология и оборудование, на котором осуществлялось выполнение экспериментальной части работы, статистический анализ полученных экспериментальных данных.

В результатах исследований (глава 3) автор приводит оригинальные экспериментальные данные, полученные лично диссертантом либо в сотрудничестве с коллегами из других научных учреждений. Автор диссертации доказательно демонстрирует молекулярную мишень - TRPC6-зависимые деполуправляемые кальциевые каналы - воздействуя на которую генетическими методами либо фармакологически возможно остановить синаптическую утрату. Автор работы демонстрирует нейропротекторный эффект, восстановление индукции долговременной потенциации, фармакологического соединения лидера в срезах мозга трансгенных мышей линии 5xFAD. Диссертант также приводит доклиническое исследование влияния положительного модулятора TRPC6 каналов на пространственную память у грызунов в модели церебральной ишемии. Полученные экспериментальные результаты корректно обработаны с применением современных методов статистики.

Обсуждение результатов представляет собой обобщение полученных результатов, сравнение их с литературными данными, анализ итогов выполненного исследования, рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы.

По теме диссертации опубликовано 14 статей в рецензируемых научных журналах, входящих в международные базы цитирования (WoS – 13, Scopus – 14), 4 статьи в журналах, входящих в РИНЦ, 1 глава в монографии. Получен 1 патент. Результаты диссертационного исследования также представлены в 15 тезисах докладов на российских и международных конференциях. Публикации отражают основные результаты, представленные в диссертационной работе.

Диссертация содержит шесть выносимых на защиту положений, которые полностью соответствуют разделам и содержанию диссертационной работы. В диссертации приведено 8 выводов и 3 положения практических рекомендаций. Все выводы обоснованы и логично вытекают из основного содержания диссертации. Степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов и практических рекомендаций соискателя следует признать высокой, что обеспечивается количественной стороной полученного экспериментального материала и качеством его обработки.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы. Результаты исследований Е.А. Попугаевой могут быть полезны для научно-исследовательских работ, проводимых в Институте физиологии им Павлова РАН (Санкт-Петербург), а также в Институте экспериментальной медицины (ФГБНУ «ИЭМ», Санкт-Петербург), Институте эволюционной физиологии и биохимии им Сеченова РАН (Санкт-Петербург), Санкт-Петербургском государственном химико-фармацевтическом университете МЗ РФ (Санкт-Петербург), НИИ фармакологии им В.В. Закусова (Москва), учреждениях Российской академии наук, Министерства здравоохранения РФ, Министерства науки и высшего образования РФ.

Замечания и вопросы. Принципиальных замечаний и возражений по диссертационной работе нет. Однако в ходе рецензирования диссертационной работы возник с вопрос, требующий дополнительного пояснения и уточнения.

Диссертационная работа посвящена изучению модуляторов нейрональной кальциевой сигнализации с целью разработки новых препаратов для лечения БА.

Вопрос: насколько специфичен обнаруженный механизм? Свободные ионы кальция, находятся в нейронах в чрезвычайно низких концентрациях, но тем не менее, участвуют в модуляции многих внутриклеточных процессах. Работа Е.А. Попугаевой вносит значительный вклад в исследование специфической фармакологической активности новых перспективных препаратов для лечения БА. Поэтому ответ на этот вопрос является принципиально важным с точки зрения перехода к дальнейшим доклиническим и клиническим исследованиям.

В целом работа производит весьма положительное впечатление, и по сути, и по оформлению. Вопрос не затрагивает существа работы и сформулирован в плане дискуссии.

Заключение. Диссертация Попугаевой Елены Александровны «Фармакологическая коррекция кальциевой дисрегуляции в нейронах гиппокампа – новый подход к лечению болезни Альцгеймера», представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук является законченной, самостоятельно выполненной научной квалификационной работой, в которой разработаны теоретические положения о новых молекулярных мишенях и подборе химических соединений, которые прицельно воздействуют на новую молекулярную мишень, демонстрируют нейропротекторные свойства в клеточных и животных моделях болезни Альцгеймера и могут быть использованы для создания новых нейрофармакологических средств лечения БА. Совокупность разработанных автором положений и выводов можно квалифицировать как новое крупное научное

достижение в развитии фармакологии, физиологии и медицины в целом. Диссертация соответствует паспортам научных специальностей 14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология (областям исследования №1-4) и 03.03.01 – физиология, биологические отрасли наук (областям исследования №1-3 и №6).

Научная новизна и практическая значимость результатов исследования позволяют заключить, что данное исследование соответствует п. 9 «Положение о порядке присуждения ученых степеней» утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 с изм. от 28.08. 2017 г. № 1024, а ее автор, Попугаева Елена Александровна достойна присуждения ученой степени доктора биологических наук.

Отзыв на диссертацию обсуждён на заседании лаборатории физиологии возбудимых мембран (протокол № 4 от «24» июня 2021 г.).

Заведующий лабораторией физиологии
возбудимых мембран ФГБУН «Институт физиологии
им. И.П. Павлова» РАН, доктор биологических наук,
профессор

Крылов Борис Владимирович

e-mail: krylov@infran.ru

тел. +79112992597

Подпись Б.В. Крылова заверяю:

«24» июня 2021 г.



Подпись руки
достоверно
ин. килцехрис

Крылова Б.В.
Соловьева О.В.