

## **ОТЗЫВ**

**официального оппонента доктора биологических наук Антонова Сергея**

**Михайловича на диссертацию**

**ПОПУГАЕВОЙ Елены Александровны**

**«ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ КОРРЕКЦИЯ КАЛЬЦИЕВОЙ ДИСРЕГУЛЯЦИИ В НЕЙРОНАХ ГИППОКАМПА – НОВЫЙ ПОДХОД К ЛЕЧЕНИЮ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА»,**

**представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальностям 14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология и 03.03.01 - физиология.**

### **Актуальность темы**

Значение исследований этиологии и механизмов развития болезни Альцгеймера (БА) трудно переоценить. В настоящее время общепринято, что основным нейротоксическим фактором болезни Альцгеймера является бета ( $\beta$ ) амилоидный пептид, накапливающийся в организме человека при патогенезе. Эта точка зрения основана на экспериментальном факте, что антитела, специфичные к этому пептиду, проявляют нейропротекторное действие. Однако в клинике препараты, изготовленные на основе моноклональных антител к растворимому бета амилоиду, не улучшают когнитивных функций пациентов. Это обуславливает целесообразность поиска других факторов патогенеза, возможно предшествующих в развитии заболевания накоплению бета амилоида. Следует также отметить, что для лечения БА используются лекарства поддерживающего характера, которые лишь временно облегчают симптоматику. В клинической практике ингибиторы ацетилхолинэстеразы и мемантин (блокатор каналов NMDA-рецепторов), ограничивающие вход кальция в цитозоль нейронов, зачастую применяются совместно для лечения легкой и умеренной форм БА, и не способны вызывать существенного замедления развития заболевания. В этой связи совершенствование фармакотерапии БА является приоритетным направлением мировой фармакологии. Кроме того, разработка эффективных средств патогенетической терапии БА требует совершенствования наших представлений о механизмах, лежащих в основе нейродегенерации, и разработки новых диагностических подходов для оценки действия препаратов с учетом нейрохимических и морфологических особенностей нейронов при нормальном старении и в условиях развития деменции. Очевидная комплексность факторов, инициирующих развитие спорадической БА, определяет необходимость

проведения исследований с использованием широкого спектра экспериментальных подходов молекулярной и клеточной биологии, фармакологии электрофизиологии, а также совершенных методов микроскопии, с целью выявления молекулярных основ изменения физиологических функций нейронов. Представляется возможным выявить новые мишени фармакологического воздействия и найти препараты, обеспечивающие долговременный терапевтический эффект.

На основании вышесказанного можно утверждать, что диссертационная работа Попугаевой Е.А. посвящена решению одной из актуальных проблем современной нейрофармакологии, а именно, изучению фармакологической коррекции кальциевой дисрегуляции нейронов для предотвращения развития БА.

### **Научная новизна и научно-практическая значимость**

Работа Попугаевой Е.А. выполнена на современном научно-методическом уровне, а полученные результаты имеют большое значение, как с точки зрения фундаментальной науки, так и в отношении их практического применения.

С использованием *in vitro* и *in vivo* моделей БА получены фундаментальные результаты, демонстрирующие, что изменения кальций-зависимых сигнальных путей TRPC6-зависимого нейронного депо-управляемого входа кальция лежат в основе дестабилизации синаптических контактов. Доказано, что тонкая регулировка кальциевой сигнализации в дендритных грибовидных шипиках позволяет ограничить развитие амилоидной токсичности и восстановить синаптическую пластичность в срезах мозга трансгенных мышей - модели БА. Охарактеризованы свойства модуляторов депо-управляемых кальций-зависимых каналов, позволяющие рекомендовать их в качестве перспективных фармакологических препаратов лечения БА, обусловленной нарушением внутриклеточной регуляции кальция. В частности, соединения - производные пиперазина - способны взаимодействовать с клеточной мишенью TRPC6-зависимым депо-управляемым кальциевым каналом в гиппокампе. Показано, что терапевтические свойства могут быть выявлены, как у агонистов, так и антагонистов депо-управляемых кальциевых каналов.

Таким образом, сформулирована новая стратегия фармакологической коррекции кальциевой дисрегуляции в нейронах гиппокампа и научно обоснована целесообразность разработки лекарственных препаратов для терапии проявлений болезни Альцгеймера, обусловленных нарушением внутриклеточной кальциевой регуляции.

Определены базовые химические структуры, воздействующие на каналы TRPC6 по депо-зависимому пути.

На клеточной модели амилоидной синаптотоксичности установлен нейропротекторный эффект соединений, производных пиперазина. Показано, что соединение N-(2-хлорфенил)-2-(4-фенилпиперазин-1-ил)ацетамид является агонистом каналов TRPC6 в гиппокампальных клетках генетических моделей БА. Впервые этот препарат - предложен в качестве базовой химической структуры, на основе которой возможна разработка терапии форм БА с избыточным содержанием кальция в эндоплазматическом ретикулуме.

На генетической модели с гиперэкспрессией PSEN1ΔE9 установлен нейропротекторный эффект соединения 4-N-[2-(4-феноксифенил)этил]хиназолин-4,6-диамина и впервые показано, что это вещество является антагонистом TRPC6-зависимого депо-управляемого входа кальция в нейронах гиппокампа. Это соединение предложено в качестве базовой химической структуры для разработки терапии форм БА с истощенными запасами кальция в эндоплазматическом ретикулуме.

Рекомендованные в настоящей работе соединения для разработки фармакотерапии БА воздействуют на TRPC6 каналы гиппокампа, активируемые по депо-зависимому пути, ранее не рассматриваемые в качестве перспективной фармакологической мишени поиска лекарств против БА. Используемые в настоящее время препараты для лечения пациентов с БА на данную мишень не влияют.

Разработанная *in vitro* модель амилоидной синаптотоксичности может быть использована для скрининга фармакологически активных соединений по критерию способности защищать синаптические контакты от амилоидной токсичности и регулировать кальций-зависимые пути в нейронах гиппокампа.

Результаты исследований внедрены в практику учебной работы Высшей школы биомедицинских систем и технологий ФГАОУ ВО СПбПУ, кафедры фармакологии и клинической фармакологии ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России, а также в исследовательскую работу лаборатории молекулярной нейродегенерации ФГАОУ ВО СПбПУ.

Практическую значимость результатов подтверждает полученный автором патент на изобретение «Применение производных пиперазина для лечения болезни Альцгеймера и деменций альцгеймеровского типа с нарушенной кальциевой сигнализацией» Патент России № 2676100. 2018. / Попугаева Е.А, Чернюк Д.П., Безпрозванный И.Б. (РИНЦ).

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

Рассматривая обоснованность диссертационной работы Попугаевой Е.А., в первую очередь, следует обратить внимание на комплексность разработки и решения поставленных задач. В опытах использовали фармакологические и генетические модели БА. Индукцию долговременной потенциации синаптической передачи изучали в срезах мозга мышей линии 5xFAD. Ишемию головного мозга моделировали на анестезированных животных методом односторонней окклюзии среднемозговой артерии. Для исследования влияния соединений на краткосрочную и долгосрочную память использовали поведенческий тест «лабиринт Барнса». Применялась двухфотонная визуализация морфологии дендритных шипиков в срезах гиппокампа взрослых мышей и конфокальная визуализация процессов и структуры шипиков в первичной культуре нейронов. Изменения концентрации кальция в соме и дендритных шипиках нейронов после воздействия на клетки фармакологических агентов и экспрессии мутантных белков оценивали с применением лазерной сканирующей микроскопии. Для вирусной доставки генетического материала в гиппокамп взрослых мышей с помощью аденоассоциированных вирусных векторов применяли стереотаксические операции. В исследовании использовали стандартные молекулярно-биологические методы: вестерн-блоттинг, генотипирование, кальций фосфатную трансфекцию нейронов, иммуноцитохимию.

Применение современных методик и адекватных тест-систем, выбранный дизайн исследования обеспечивает комплексный подход и объективность полученных результатов. Данные, полученные в ходе исследования, подвергались адекватной статистической обработке. Научные положения, выводы и рекомендации обоснованы, корректно сформулированы, базируются на достоверных данных и имеют несомненное научное и практическое значение.

Цель диссертационной работы состояла в выявлении фармакологических мишеней и регулирующих их базовых химических структур, перспективных для фармакологической разработки средств лечения болезни Альцгеймера, на основе анализа кальций зависимых процессов, вовлеченных в патогенез заболевания.

Дизайн исследований четко спланирован и логичен. Автор использует методические подходы к работе с животными, соответствующие отечественным и международным этическим нормам. В работе показано, что кальциевая дисрегуляция в нейронах гиппокампа дестабилизирует синаптические контакты при моделировании амилоидной токсичности. Как при гипоактивности, так при и гиперактивности депонированных кальциевых каналов снижается количество синаптических контактов в гиппокампе, а фармакологическая коррекция кальциевой дисрегуляции в нейронах

гиппокампа может являться стратегией для разработки средств лекарственной терапии проявлений болезни Альцгеймера, обусловленных нарушением  $Ca^{2+}$  зависимых сигнальных путей. При этом каналы TRPC6 в составе депо-управляемых кальциевых каналов могут являться молекулярной мишенью для разработки лекарственных препаратов. Модуляторы TRPC6-зависимого нейронного депо-управляемого входа кальция в гиппокампе (производные пиперазина, этаноламина и хиназолиндиамина) являются перспективными для разработки средств лечения болезни Альцгеймера. С этой целью могут использоваться как агонисты, так и антагонисты депо-управляемых кальциевых каналов.

Обоснованность и достоверность положений, выносимых на защиту, и выводов определяется достаточным фактическим материалом, высоким методическим уровнем проведенного исследования, информативностью использованных в работе методов исследования, корректностью статистической обработки данных. Сами данные получены на сертифицированном современном оборудовании. Выводы логично вытекают из полученных результатов и соответствуют целям и задачам исследования. Личный вклад автора является очевидным и определяющим на всех этапах работы и заключается в постановке задач исследования, участии в проведении экспериментов и обработке данных, анализе, обобщении и изложении результатов. Полученные результаты прошли широкую международную научную экспертизу, о чем свидетельствует большое количество публикаций (13 статей) в рецензируемых рейтинговых зарубежных научных журналах.

Таким образом, четко спланированный поэтапный дизайн исследования и использование адекватных научных методов позволили решить поставленные задачи на высоком научно-практическом уровне. Научные положения, выводы и рекомендации сформулированные в диссертации, основаны на достоверных результатах.

#### **Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации, оценка ее завершенности**

Структура работы соответствует требованиям Минобрнауки Российской Федерации.

Диссертация объемом 168 страниц написана традиционно и состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, результатов исследования, их обсуждения, 4 таблиц, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и условных обозначений и списка цитируемой литературы. Диссертация хорошо иллюстрирована 43 комбинированными рисунками.

Список цитируемой литературы составляет 297 источников, включая 6 статей в отечественной печати.

Во введении обоснованно изложены вопросы актуальности проблемы, сформулированы цели и задачи исследований, четко обозначена новизна полученных результатов и их практическая значимость.

В первой главе автор подробно описывает современное состояние изучаемой проблемы, приводит подробное описание кальциевой гипотезы болезни Альцгеймера и молекулярно-биологических основ кальциевой дисрегуляции в нейронах гиппокампа при БА. В обзоре литературы подробно описана роль бета-амилоида в регуляции кальциевого сигналинга нейронов и морфо-функциональных изменений грибовидных дендритных шипиков, связанных со значительным уменьшением их числа и плотности образования на единицу длины дендрита в трансляционных моделях БА, что является фенотипическим проявлением деменции. Автор всесторонне описывает роль различных ионных каналов в запуске кальциевой дисрегуляции нейронов и ее коррекции, что обеспечивает читателя базовой информацией для понимания и восприятия последующих исследований. Рассматривая обзор литературы в целом, очевидно, что он написан в соответствии с логикой собственных исследований, налицо знание истории и настоящего изучаемого вопроса.

Во второй главе подробно описываются объекты и методы исследования, химические соединения, плазмиды и вирусы, используемые в опытах, а также манипуляций с животными, другие технологии и процедуры, необходимые для проведения экспериментов *in vitro* и *in vivo*, и методы статистической обработки данных.

В третьей главе описаны результаты собственных исследований, позволивших выявить новую мишень фармакологического воздействия, являющуюся перспективной для разработки оригинальных лекарственных средств лечения болезни Альцгеймера, которой являются TRPC6-зависимый нейронный депо-управляемый вход кальция, и охарактеризовать фармакологически активные вещества, агонисты и антагонисты, способные взаимодействовать с этой мишенью. Эти соединения рекомендованы в качестве базовых для последующих модификаций и фармакологической разработки.

В четвертой главе обсуждаются полученные в ходе диссертационной работы результаты с привлечением данных отечественных и зарубежных исследователей. Автором убедительно доказаны и соотнесены с имеющимися современными научными представлениями по изучаемой проблеме положения, выносимые на защиту.

Выводы диссертации соответствуют поставленным задачам, что характеризует завершенность работы.

Автореферат достаточно полно отражает содержание и основные результаты исследований.

Результаты диссертационного исследования были представлены в виде докладов на региональных и международных мероприятиях и конференциях. По материалам диссертации опубликовано 33 работы, в том числе 18 статей в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки России, включая 14 статей в изданиях, входящих в базы данных Web of Science и Scopus.

Диссертация написана грамотным научным литературным языком и производит положительное впечатление.

### **Замечания по диссертационной работе**

Принципиальных замечаний по структуре диссертации, использованным материалам и методам, изложению полученных результатов и содержанию работы нет. Встречаются стилистические неточности и отдельные опечатки, которые не снижают достоинств работы и общего положительного впечатления.

В качестве научной дискуссии отмечу, что кальциевые флуоресцентные зонды Fluo-3 AM и Fura AM являются эфирными производными соответствующих кальций – чувствительных флуорохромов. Эфирные формы необходимы для их проникновения через мембрану и накопления в клетках. В клетках происходит реакция этерификации, и они превращаются в Fluo-3 и Fura, теряя способность проникать через плазматическую мембрану, следовательно, выходить из них. Таким образом, упомянув использование AM-форм для загрузки красителей в методике, далее в результатах и подписях к рисункам нет необходимости писать об этом, так как в клетках работают Fluo-3 и Fura.

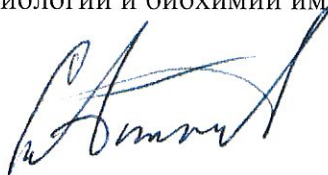
В качестве средств коррекции БА предлагается использовать как агонисты (активаторы), так и антагонисты (ингибиторы) кальциевых депо-управляемых каналов (TRPC6 – зависимый нДУВК). Поскольку обычно лекарственные препараты являются либо агонистами, либо антагонистами, например, мемантин блокирует вход кальция через NMDA-рецепторы в нейроны, а антихолинэстеразные вещества (ингибиторы ацетилхолинэстеразы) вызывают накопление ацетилхолина и десенситизацию никотиновых холинорецепторов, что в обоих случаях уменьшает накопление кальция в нейронах. В этом случае лекарства действуют аддитивно. В случае использования агонистов и антагонистов, казалось бы, одни должны компенсировать действие других, так как их эффект является противоположным. Возникает вопрос, почему, тем не менее, вы предлагаете использование обоих типов препаратов в качестве лекарств от БА?

## Заключение

Диссертация Попугаевой Елены Александровны «Фармакологическая коррекция кальциевой дисрегуляции в нейронах гиппокампа – новый подход к лечению болезни Альцгеймера», представленная к защите на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальностям 14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология и 03.03.01 - физиология является законченной научно-квалификационной работой, в которой на основании полученных результатов автором разработаны теоретические положения и выводы о перспективности использования регуляторов нейронного депо - управляемого входа кальция в качестве лекарственных препаратов против болезни Альцгеймера, совокупность которых является крупным достижением в развитии фармакологии и клинической фармакологии и физиологии. Диссертационная работа соответствует требованиям пп. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 (в ред. Постановления Правительства РФ от 21.04.2016 г. № 335), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а ее автор заслуживает присуждения искомой степени доктора биологических наук по специальностям 14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология и 03.03.01 - физиология.

Официальный оппонент:

Заведующий лабораторией сравнительной нейрофизиологии  
Федерального государственного бюджетного учреждения науки  
Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской  
академии наук,  
доктор биологических наук  
27 сентября 2021 г.



Сергей Михайлович Антонов

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской  
академии наук (ИЭФБ РАН)  
Адрес: 194223, г. Санкт-Петербург, проспект Тореза д. 44  
Телефон: +7 (812) 552-79-01  
Электронная почта: office@iephb.ru

Подпись С.М. Антонова заверяю. Ученый секретарь Федерального государственного  
бюджетного учреждения науки Института эволюционной физиологии и биохимии им.  
И.М. Сеченова Российской академии наук,  
кандидат биологических наук  
27 сентября 2021 г.



Гальперина Елизавета Иосифовна