

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук Коноровой Ирины Львовны на диссертационную работу **Бадлаевой Алины Станиславовны** на тему **«Взаимосвязь митохондриальной и аутофагоцитарной дисфункции в нейронах головного мозга при старении»**, представленную к защите на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям 1.5.22. Клеточная биология, 3.3.2. Патологическая анатомия.

Актуальность темы исследования

Актуальность избранной темы является наиважнейшей в области биомедицинских исследований, так как старение организма, изучению механизмов которого посвящена диссертация, часто ассоциируется с болезнями, умственной, физической недостаточностью и представляет собой медико-социальную и экономическую проблему. В 2023 г. в России средняя продолжительность жизни повысилась до 73 лет и ожидается дальнейший её рост. Одновременно отмечено увеличение численности населения пожилого и старческого возраста, значительная часть которого страдает снижением когнитивных функций. Старение является фактором риска развития нейродегенеративных заболеваний. По последним данным литературы, ключевыми факторами в регуляции процесса старения головного мозга являются митохондрии, система аутофагоцитоза и взаимодействие между ними. Сложность и многообразие путей их взаимодействия затрудняют понимание закономерностей развития процесса и разработку подходов к таргетной терапии старения мозга. В доступной литературе лишь в единичных публикациях митохондрии и аутофагию рассматривают как единую сигнальную платформу, регулирующую внутриклеточные процессы, в том числе при старении.

В связи с этим, актуальность темы диссертационного исследования А.С. Бадлаевой, целью которого было определение взаимосвязи между параметрами морфофункционального состояния митохондрий и компонентов системы аутофагоцитоза в нейронах головного мозга в процессе старения, не вызывает сомнений. Полученные диссертанткой новые данные углубляют понимание возрастных изменений активности митохондрий и системы аутофагоцитоза в клетках нервной ткани человека и лабораторных животных, расширяют представление об их взаимодействии, могут лечь в основу развития трансляционных технологий в области клинического изучения старения.

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

Диссертационная работа А.С.Бадлаевой четко спланирована, полученные автором результаты достоверны, выводы и заключения достаточно обоснованы. В частности основные положения обоснованы грамотным методологическим подходом к исследованию; достоверность полученных результатов обусловлена применением комплекса современных методов исследования, включающих как классический гистологический метод; так и гистохимический метод, позволяющий достоверно выявлять различные структурные компоненты ткани; иммуногистохимическое (ИГХ) окрашивание с использованием маркеров двух типов аутофагии (LC3B, HSP70, LAMP2A), маркера АТФ-синтазы (АТР5А1) и маркера системы контроля качества митохондрий (DJ-1), а также электронно-микроскопическое исследование.

Высокая точность и объективность выполненных в ходе исследования измерений обусловлена использованием иммуностейнера для ИГХ окрашивания, оцифровкой микропрепаратов и компьютерной морфометрией интенсивности окрашивания ИГХ-маркеров. Результаты работы иллюстрированы достаточным количеством микрофотографий гистологических препаратов и электроннограмм, а также представлены в виде диаграмм и таблиц. В диссертационной работе автором использована корректная статистическая обработка результатов, включающая в себя параметрические и непараметрические методы.

Положения, выдвинутые на защиту, и выводы полностью обоснованы результатами проведенных исследований и логично вытекают из материалов диссертации.

Научная новизна

На секционном материале, полученном от умерших молодого и старческого возраста, автором дана развернутая характеристика сенильных изменений различных структурно-функциональных зон головного мозга человека, которые вовлекаются в патогенез нейродегенеративных заболеваний, ассоциированных с возрастом, и впервые проведено сопоставление с аналогичными данными, полученными в эксперименте *in vivo* на молодых и старых лабораторных животных (выводы №1, №2, №3).

Диссертанткой показаны различия патоморфологических сенильных изменений в сером и белом веществе головного мозга человека при сохранении общих типовых проявлений нейродегенерации. У лабораторных животных выявлена тенденция к гибе-

ли нейронов при старении, в то время как изменений ткани мозга, характерных для нейродегенеративных процессов у человека, у животных не выявлено (выводы №4, №7).

Впервые в нейронах головного мозга человека выявлена прямая корреляционная зависимость между маркерами макроаутофагии LC3B, шаперон-индуцированной аутофагии HSP70 и LAMP2A и митохондриальным маркером АТФ-синтазы ATP5A1, а также обратная корреляционная зависимость между маркерами шаперон-индуцированной аутофагии и маркером системы контроля качества митохондрий DJ-1 (выводы №6, №8).

Автором работы обнаружено, что в исследованных структурах головного мозга умерших в старческом возрасте интенсивность окрашивания маркера АТФ-синтазы выше, чем у умерших в молодом возрасте (вывод №5). В сочетании с данными электронно-микроскопического исследования это подтверждает факт увеличения размеров митохондрий при старении, что является компенсаторно-приспособительной реакцией (вывод №4).

Достоверность полученных результатов

Автором использован комплекс современных морфологических методов, адекватных поставленной цели и задачам исследования – гистологический, гистохимический, иммуногистохимический, электронно-микроскопический и морфометрический. Полученные количественные данные обработаны с использованием современных компьютерных программ статистического анализа, а именно, программы GraphPad Prism 9.3.1 (Dotmatics, США) и StatTech 3.0.6 (ООО "Статтех", Россия). Результаты диссертационной работы документированы полноценным иллюстративным материалом и суммированы в таблицах и графиках, что облегчает восприятие полученных результатов.

Практическая и теоретическая значимость работы

Данные, полученные в диссертационной работе А.С.Бадлаевой, обогащают знание возрастных изменений митохондриальной и аутофагоцитарной активности в клетках нервной ткани человека и лабораторных животных, необходимое для развития трансляционных технологий в области клинического изучения старения. Результаты диссертационной работы уточняют и углубляют имеющиеся сведения о сенильных изменениях различных зон головного мозга. Дают представление о морфофункциональных отличиях серого и белого вещества в головном мозге в старческом возрасте по сравнению с таковым в молодом возрасте и их феноменологической схожести с нейродегенеративными процессами, развивающимися при возраст-ассоциированных заболеваниях.

Полнота освещения результатов диссертации в печати

По теме диссертационного исследования опубликовано 8 научных работ, из которых 2 статьи опубликованы в рецензируемых научных журналах, входящих в список изданий, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации для публикации основных научных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата и доктора наук, 1 публикация в зарубежном издании, входящем в Web of Science.

Содержание и оформление диссертации

Работа построена в основном по ГОСТу Р 7.011-211, изложена на 124 страницах машинописного текста и состоит из оглавления, введения, списка сокращений, 3-х глав: «Обзор литературы», «Материал и методы», «Результаты и их обсуждение», а также выводов и списка цитируемой литературы. Библиографический список содержит 164 наименования литературных источников, из которых 20 отечественных и 144 иностранных. Диссертация содержит 22 таблицы и проиллюстрирована 30 рисунками.

Текст диссертации написан грамотным литературным языком.

Во введении представлены актуальность темы, научная новизна, цель и задачи исследования, методология и методы исследования, теоретическая и практическая значимость, положения, выносимые на защиту, степень достоверности и апробация результатов.

Глава «Обзор литературы» структурирована, логично выстроена и полностью освещает состояние проблемы. В ней проработана литература зарубежных и отечественных авторов, основной массив которой представлен публикациями за последние пять лет. В разделе кратко и четко изложены современные сведения о морфологических изменениях нервной ткани головного мозга при старении; актуальных аспектах изучения клеточных механизмов старения головного мозга; роли аутофагоцитарной дисфункции в процессе старения, в том числе макроаутофагии, шаперон-индуцированной аутофагии и потенциальных механизмах аутофагоцитарной дисфункции при старении; роли митохондриальной дисфункции в процессе старения, включая изменение морфологии митохондрий с возрастом, окислительный стресс и биоэнергетический дефицит, нарушение системы «контроля качества» митохондрий; взаимодействии митохондрий и системы аутофагоцитоза, в частности о митохондриях и формировании фагофора, митохондриях как регуляторах активности аутофагии, митофагии, митохондриях и шаперон-индуцированной аутофагии.

Обзор литературы иллюстрирован разработанными автором красочными схемами основных положений рассматриваемых вопросов.

В главе «Материал и методы» описана схема и методология проведения исследований.

Патолого-анатомическое исследование выполнено на головном мозге 30-ти умерших старческого и 10-ти молодого возраста, отвечающих критериям отбора (включения и исключения из исследования), разработанным автором, которые были получены в отделении патологической анатомии Государственного бюджетного учреждения здравоохранения г. Москвы «Городская клиническая больница №1 им. Н.И. Пирогова».

Экспериментальное исследование проведено на 20-ти самцах беспородных мышей в возрасте 2-х и 18-ти месяцев, содержащихся в виварии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научный центр неврологии» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Автором приведено достаточно полное описание использованных морфологических методов, включая методы: анализа макроскопических параметров сенильных изменений головного мозга; обзорной световой микроскопии с применением гистологических и гистохимических методов окрашивания; иммуногистохимического исследования с последующим определением интенсивности окрашивания выбранных маркеров, метода электронной микроскопии и методов математической обработки полученных количественных данных.

Глава «Результаты и их обсуждение» состоит из 8 разделов, включая 5 разделов с полученными собственными данными и 3 раздела с их обсуждением. В ней достаточно подробно изложено и хорошо иллюстрировано описание морфологических изменений структурных компонентов ткани головного мозга человека и лабораторных животных при старении, результаты ультраструктурного исследования нейронов головного мозга экспериментальных животных, а также иммуногистохимического исследования маркёров митохондриальной и аутофагоцитарной дисфункции нейронов в головном мозге человека и экспериментальных животных.

В заключении суммированы полученные результаты и их обсуждение.

Выводы логично завершают обсуждение результатов исследования, соответствуют поставленным задачам и позволяют достичь цели исследования, они полностью отражают суть проделанной работы и в достаточной степени обоснованы.

Соответствие содержания автореферата основным положениям и выводам диссертации

Автореферат написан грамотным литературным языком, оформлен согласно требованиям ВАК, его содержание соответствует основному содержанию диссертации и отражает его в полной мере.

Недостатки и замечания по диссертационной работе

При положительной оценке диссертационной работы А.С.Бадлаевой в целом, следует сделать некоторые частные замечания и пожелания.

1. Автор не всегда придерживается требований к оформлению диссертаций, рекомендованных ГОСТ Р 7.011-2011. В частности нумерация рисунков и таблиц не сквозная, а по главам, но не содержит номер главы, в связи с чем разные рисунки и таблицы имеют один и тот же номер и не идентифицируются однозначно; подрисуночные подписи на стр. 16, 24, 30, 34, 49, 50 переходят на следующую страницу; отступы заголовков глав отстоят от текста не на 3, а на 1,5 межстрочных интервала; список сокращений и условных обозначений расположен не после основного текста диссертации, а после введения; на стр.73 заголовок таблицы расположен на одной странице, а сама таблица на другой.
2. В главе «Обзор литературы», к сожалению, отсутствует обоснование выбора областей головного мозга, сделанного автором, для сравнительного анализа в патолого-анатомическом исследовании.
3. В главе «Материал и методы» указано, что исследуемую группу умерших старческого возраста составили 10 мужчин и 20 женщин, а контрольную группу молодого возраста - 7 мужчин и 3 женщины. При этом не указано, учитывала ли автор гендерную неравноценность групп сравнения при определении морфологических изменений структурных компонентов ткани головного мозга человека при старении.
4. Там же на стр. 38 сообщается, что: «Исследование проводили на 20 самцах беспородных мышей.» Непонятен термин «беспородные».
5. Там же на стр. 39 указано, что: «Для исследования был использован набор из 5 антител, который, согласно литературным данным, в достаточной степени позволяет оценить функциональное состояние системы аутофагоцитоза и митохондрий в нейронах.» При этом отсутствуют как ссылка на первоисточники, так и указание на производителя, что не позволяет оценить селективность

антител, использованных в иммуногистохимическом исследовании, и адекватность выбора.

6. В главе «Результаты и их обсуждение» на стр. 44. автор делает вывод, что: «масса головного мозга умерших в старческом возрасте была ниже на 9,7% по сравнению с группой молодого возраста». Неясно как можно сделать такой вывод без учёта противоположной направленности гендерных различий в группах сравнения. В литературе многими авторами показано, что масса головного мозга женщин на 100 – 200 г меньше массы мозга мужчин. Возможно, меньшая массы головного мозга в группе умерших старческого возраста обусловлена тем, что в ней количество умерших женщин вдвое больше, чем мужчин, в то время как в контрольной группе молодого возраста, наоборот, вдвое больше мужчин.
7. Там же на стр. 46. приведены количественные изменения числа нейронов в различных структурах головного мозга человека в разных возрастных группах. При этом также не указаны гендерные различия данных показателей в каждой группе. Из работ И.Н. Боголеповой известно, что плотность нейронов в отдельных структурах головного мозга, например, в речедвигательной коре больших полушарий различна. Возникает вопрос, нет ли подобных различий в областях головного мозга, исследованных диссертанткой?
8. Там же на стр.64 в таблице 11 некорректно приведены численные показатели погрешности (количество знаков после запятой у погрешности не соответствует количеству знаков у числа). Возникает вопрос, возможно, в представлении данных погрешности есть опечатка? В противном случае выводы автора о статистической значимости различий фактора формы митохондрий ($0,661 \pm 0,19$ и $0,685 \pm 0,19$ при $p < 0,001$) и площади митохондрий ($0,216 \pm 0,17$ и $0,232 \pm 0,18$ при $p < 0,025$) при перекрывающихся погрешностях некорректны.
9. В выводе №1 последнее предложение: «...Макроскопически отмечается снижение массы головного мозга и истончение коры полушарий большого мозга» вызывает сомнение. Некорректно делать подобное заключение без учета гендерных различий морфологии мозга, поскольку из литературы известно, что у мужчин и женщин есть многочисленные различия не только по массе головного мозга, но также по толщине коры в левом и правом полушариях и по плотности нейронов в различных структурах (Боголепова И.Н., Малофеева Л.И., 2014).

Следует подчеркнуть, что отмеченные недостатки несколько снижают качество работы, однако они не влияют на главные результаты диссертации, её научно-практическую значимость и достоверность сделанных автором выводов.

Заключение

Таким образом, диссертационная работа А.С. Бадлаевой «Взаимосвязь митохондриальной и аутофагоцитарной дисфункции в нейронах головного мозга при старении» является законченной научно-квалификационной работой, выполненной под руководством доктора медицинских наук, профессора В.С. Сухорукова и доктора медицинских наук, профессора Т.С. Гулевской, в которой решены поставленные задачи, имеющие существенное значение для клеточной биологии и патологической анатомии, в том числе связанные с изучением особенностей митохондриально-аутофагоцитарного взаимодействия при старении головного мозга.

По своей актуальности, научной новизне, объему выполненных исследований, значимости полученных данных диссертация Бадлаевой А.С. полностью соответствует требованиям п.9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013г. №842 (в редакции постановлений Правительства РФ от 21.04.2016 г. №335, от 02.08.2016 г. №748, от 29.05.2017 №650, от 28.08.2017 г. №1024, от 01.10.2018 г. №1168, от 20.03.2021 №426, от 11.09.2021 №1539 с изменениями, внесенными постановлением Правительства РФ от 26.05.2020 г. №75, от 20.03.2021 г. №426, от 11.09.2021 г. №1539), предъявляемых к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор Бадлаева Алина Станиславовна заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям 1.5.22. Клеточная биология, 3.3.2. Патологическая анатомия.

Доктор биологических наук, профессор кафедры
гистологии, эмбриологии и цитологии

ФГБОУ ВО «МГМСУ им. А.И. Евдокимова»
Минздрава России


27.11.2023г.

Конорова И.Л.

Подпись д.б.н. Коноровой И.Л. заверяю:

Ученый секретарь ФГБОУ ВО «МГМСУ им. А.И. Евдокимова»
Минздрава России

Доктор медицинских наук, профессор





Васюк Ю.А.

105275, г. Москва, ул. Бориса Жигуленкова, д.23

+79154768018, konorova.irina@yandex.ru