

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора биологических наук, профессора,
члена-корреспондента Российской академии наук
Балабана Павла Милославовича
на диссертацию Екатерины Александровны Никитиной на тему
«Физиолого-генетический анализ механизмов патогенеза
нейродегенеративных заболеваний с привлечением моделей на дрозофиле»,
представленную на соискание учёной степени доктора биологических наук
по специальности 03.03.01 – физиология и 03.02.07 - генетика

Актуальность работы. Диссертационное исследование Никитиной Е.А. посвящено актуальной теме: раскрытию ранее неизвестных механизмов патогенеза нейродегенеративных заболеваний в новых экспериментальных моделях на дрозофиле. Следует отметить, что в настоящее время имеющихся знаний о причинах и механизмах развития нейродегенерации недостаточно для понимания патогенетической основы данного заболевания. Весьма вероятно, что важную роль при развитии нейродегенеративных процессов, особенно на ранних стадиях, играет нарушение процессов ремоделирования актинового цитоскелета, однако до настоящего времени этот вопрос совершенно не исследован. Детальному и комплексному исследованию этой актуальной проблемы и посвящена диссертационная работа Е.А. Никитиной, в которой не только предложены и обоснованы новые экспериментальные модели нейродегенеративных заболеваний на дрозофиле, но и раскрыта роль компонентов LIM-киназного каскада, белков теплового шока, эпигенетических регуляторов в генезе когнитивных и моторных нарушений.

Необходимо подчеркнуть важность и перспективность эпигенетического аспекта исследований автора. В последнее время стало ясно, что НДЗ могут возникать не в результате мутации какого-либо одного гена, а определяются дисрегуляцией микроРНК. Извечный вопрос о роли наследственности и среды в определении таких сложных полигенных признаков, как поведение, особенности условно-рефлекторной деятельности и старение, должен обсуждаться с учетом “эпигенетического форматирования” участвующих в этих процессах генов, т.е. зависящего от возраста изменения регуляции экспрессии генов без изменения их первичной последовательности.

Изучение генетических и эпигенетических детерминант нарушений когнитивных и моторных функций подразумевает установление роли конкретных генов и их эпигенетического состояния в детерминации их проявлений. Решение этой проблемы послужит не только созданию новых возможностей для медико-генетического консультирования и предиктивной медицины, но и развитию фундаментальных знаний о механизмах реализации и контроля когнитивных и моторных функций, созданию новых средств фармакологической и генной терапии их нарушений. Одним из направлений исследований для ее решения является выявление генов и

исследование молекулярных механизмов их участия в реализации и контроле когнитивных и моторных функций у модельного объекта – дрозофилы.

Именно с использованием дрозофилы в качестве модельного объекта автором проведено изучение роли LIMK1 как ключевого узла взаимодействия между различными генными сетями, участвующими в регуляции функциональных процессов мозга.

Таким образом, комплексный анализ основных признаков нейродегенеративных заболеваний является **актуальным направлением**, которое позволит приблизиться к более глубокому пониманию механизмов развития нейропатологий.

Структура диссертации. Материал изложен пространно и ясно, диссертация хорошо структурирована и оформлена. Работа изложена на 460 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, изложения материалов и методов исследования, собственных результатов исследования и их обсуждения, общего обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа иллюстрирована 150 рисунками и 26 таблицами. По объему соотношение разделов в диссертации сбалансировано. Список литературы включает 820 источников, в том числе 50 отечественных и 770 иностранных.

Во введении обоснована актуальность проведенного исследования, четко и корректно сформулированы цель и задачи исследования, научная новизна, теоретическая и практическая значимость, положения, выносимые на защиту.

В «Обзоре литературы» приводится развернутое описание современных гипотез и известных механизмов патогенеза НДЗ. Большое внимание уделено моделированию нейродегенеративных нарушений на животных, в особенности на плодовых мухах *Drosophila melanogaster*.

В главе «Материалы и методы» изложены общая характеристика экспериментального материала (мутантные и трансгенные линии мух, а также линии дикого типа), методы анализа поведения мух в разные периоды онтогенеза, а также описаны иммунофлуоресцентные, микроскопические методики и обширный арсенал ультрасовременных молекулярно-генетических методов, позволяющих сделать обоснованное заключение по исследуемой проблеме. Подробно описаны методы биоинформационного анализа, не вызывает сомнений и статистическая обработка данных.

В главе «Результаты и обсуждение» приведены результаты собственных исследований и анализ полученных данных. Экспериментальный материал изложен очень детально и хорошо проиллюстрирован рисунками и таблицами. Обращает на себя внимание прекрасное качество представленных репрезентативных микрофотографий, что безусловно свидетельствует о высоком методическом уровне, на котором проведены эти исследования.

В экспериментальной части работы Екатерина Александровна проводит исследование особенностей формирования памяти у самцов *D.*

melanogaster с использованием условно-рефлекторного подавления ухаживания. Полученные данные позволяют автору предположить, что LIMK1 вносит существенный вклад в функционирование нервной системы как центральной, так и периферической, обеспечивая формирование новых связей между нейронами в зависимости от полученного опыта, и, возможно, обеспечивает компенсаторный эффект, направленный на достижение результата.

В ходе исследования Е.А. Никитиной удалось выявить нарушения двигательной активности линий, несущих мутации в рецепторной и эффекторной частях сигнального каскада ремоделирования актина. Нарушение структуры гена *limk1* приводило к наиболее существенным нарушениям двигательной активности и пространственного ориентирования личинок. Следует отметить, что результаты данной работы создают предпосылки для разработки метода экспресс-оценки действия различных фармакологических агентов на локомоторные и когнитивные способности дрозифилы.

Весьма оригинальными являются данные о распределении компонентов сигнального каскада ремоделирования актина в различных органах дрозифилы. Выявлены ранее неизвестные рCREB-обогащенные нейрональные структуры, возможно, участвующие в формировании долгосрочной памяти при условно-рефлекторном подавлении ухаживания. Показана вненейрональная локализация р-кофилина в области нейромышечных контактов дрозифилы. На основании литературных данных и результатов собственных исследований автор приходит к заключению о вовлеченности глии в функционирование сигнального каскада ремоделирования актина.

Для понимания молекулярных механизмов дисрегуляции активности LIMK1 было предпринято секвенирование ДНК-последовательности *limk1* для линий, несущих полиморфизмы по этому гену, и выявлены определенные модификации либо в структурной, либо в регуляторной областях гена *limk1*. Наибольший интерес представляет наличие вставки транспозона семейства Tc1/mariner, расположенной в 3'-UTR гена *limk1* у мутанта *agn^{ts3}*.

Особенно интересен раздел, посвященный изучению эпигенетической регуляции гена *limk1*. Удалось не только исследовать широкий спектр генетических аспектов этиопатогенеза НДЗ, но и выявить роль микроРНК как одного из ведущих факторов эпигенетической регуляции данных заболеваний. В этой связи полученные диссертантом данные о том, что мутации в гене *limk1* у *agn^{ts3}* изменяют сайты гомологии с микроРНК, создавая новые по сравнению с диким типом, представляют большой интерес для развития этой перспективной области исследований.

В «Общем обсуждении» суммированы и концептуально представлены основные результаты работы.

Завершается диссертационная работа «Заключением», где излагаются итоги выполненного исследования, перспективы дальнейшей разработки темы.

Все результаты, представленные на защиту, получены либо лично диссертантом, либо при его непосредственном участии, что подтверждается опубликованными 16 статьями в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК, и апробацией результатов на международных и российских конференциях. **Выводы** работы полностью обоснованы полученными результатами исследования.

Представленное диссертационное исследование, несомненно, обладает **научной новизной**. Е.А. Никитина впервые осуществила картирование компонентов сигнального каскада ремоделирования актина в различных органах дрозофилы, а также выявила специфическую клеточную и субклеточную локализацию различных компонентов. Ею также было обнаружено, что нарушение структуры гена *limk1* приводит к дефектам обучения, среднесрочной и долгосрочной памяти, а также локомоторного поведения, что свидетельствует о важной роли данного фермента в развитии когнитивных нарушений, в частности, при НДЗ. Получены принципиально новые данные об эпигенетической регуляции гена *limk1* и выявлена важная роль микроРНК в развитии нарушений у мутантов по гену *limk1*. Совокупность полученных в работе Е.А. Никитиной данных раскрывает один из ранее неизвестных генетических механизмов НДЗ, связанный с дефектами по гену *limk1*, и ключевую роль сигнального каскада ремоделирования актина в развитии характерных для НДЗ моторно-когнитивных нарушений.

Теоретическая и практическая значимость работы определяется полученными фундаментальными сведениями о ключевой роли компонентов LIM-киназного каскада в развитии когнитивных и моторных нарушений у дрозофилы. Эти сведения являются принципиально новыми. Они не только в значительной степени расширяют современные представления о механизмах нейродегенерации, но и, очевидно, положат начало новому перспективному направлению научных исследований, которое будет иметь не только фундаментальное, но и практическое значение, поскольку позволит выявить новые терапевтические мишени для лечения НДЗ. Кроме того, с практической точки зрения будут полезны и новые модели НДЗ на дрозофиле, адекватность которых исследована и доказана в диссертации Е.А. Никитиной. С учетом их хорошей обоснованности и удобства, данные модели могут быть успешно использованы для экспресс-тестирования эффективности различных антинейродегенеративных препаратов.

Достоверность и обоснованность положений и выводов диссертации. Экспериментальные данные, лежащие в основе диссертационного исследования Е.А. Никитиной, получены на большом объеме животных, с использованием обширного арсенала ультрасовременных методов, адекватных поставленным задачам, грамотно

статистически обработаны, достоверность представленных в диссертации материалов не вызывает сомнений.

Принципиальных **замечаний** по сути работы нет, однако, в ней присутствуют редакционные погрешности. В работе встречаются досадные опечатки, не вполне стилистически грамотные выражения.

После прочтения текста диссертации остаются следующие **вопросы**, ответы на которые хотелось бы услышать на защите:

1. Несомненно, что цитоскелет играет важнейшую роль для любой функции нервной клетки, включая пластические изменения. Однако, разные нейродегенеративные заболевания обладают собственной спецификой и нельзя исключить возможность, что нарушения регуляции цитоскелета являются конечным проявлением совсем разных по генезу процессов. Например, в результате обучения изменяется морфология синапсов и блокада нормальной работы цитоскелета без сомнений заблокирует проявления памяти. Однако, говорить о специфической роли цитоскелета в поддержании памяти не приходится, хотя без нормального цитоскелета мы не увидим проявлений памяти. Хотелось бы понять на основе проведенной автором работы, может ли быть дисрегуляция работы цитоскелета причиной (а не следствием) какой-нибудь специфической нейропатологии?
2. Известны ли к настоящему времени не корреляции между наличием/отсутствием микроРНК и физиологическим феноменом, а конкретные механизмы регуляции активности гена с участием микроРНК?

Данные вопросы носят дискуссионный характер и не отражаются на общей высокой положительной оценке диссертационной работы.

Заключение.

Учитывая совокупность представленных в работе материалов, совершенно очевидно, что диссертационная работа Е.А. Никитиной представляет собой многостороннее, фундаментальное исследование взаимодействия между различными генными сетями, участвующими в регуляции функциональных процессов мозга в норме и при патологии, что вносит значительный вклад в раскрытие ключевых механизмов нейродегенерации.

Диссертация Екатерины Александровны Никитиной на тему «Физиолого-генетический анализ механизмов патогенеза нейродегенеративных заболеваний с привлечением моделей на дрозофиле», представленная к защите на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.03.01 – физиология и 03.02.07 – генетика является законченной научно-квалификационной работой, в которой сформулированы и обоснованы научные положения, совокупность

которых можно классифицировать как новое крупное научное достижение, имеющее существенное значение для физиологии и генетики.

Принимая во внимание актуальность и объем выполненной работы, обоснованность, новизну, теоретическую и практическую значимость сделанных обобщений и выводов, можно заключить, что диссертационная работа Е.А. Никитиной полностью соответствует требованиям Положения о порядке присуждения ученых степеней (Постановление Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 года), а ее автор Никитина Екатерина Александровна достойна присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.03.01 – физиология и 03.02.07 - генетика.

Доктор биологических наук, профессор,
член-корреспондент Российской академии наук,
заведующий лабораторией клеточной нейробиологии обучения,
директор Федерального государственного бюджетного
учреждения науки
Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии
Российской академии наук
117485, Москва, ул. Бутлерова, д. 5А
Тел.: 8(495)334-41-51
e-mail: pmbalaban@gmail.com

Балабан Павел Милославович



Подпись П.М. Балабана
УДОСТОВЕРЯЮ
Зав. канц. ИВНД и НФ Друж