

ОТЗЫВ

официального оппонента Клименко Виктора Матвеевича,
доктора медицинских наук, профессора на диссертацию
Екатерины Александровны Никитиной «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

Диссертационное исследование Екатерины Александровны Никитиной посвящено комплексному анализу триады диагностических признаков нейродегенеративных заболеваний (нарушения памяти, моторные дисфункции и образование белковых агрегатов) на модели нейродегенеративных расстройств ЦНС дрозофилы с привлечением различных мутантных, несущих мутации в рецепторной и эффекторной частях сигнального каскада ремоделирования актина, и трансгенных линий, а также выявлению механизмов формирования этих нарушений.

Актуальность работы. Автор диссертации, цитируя работу Владислава Сергеевича Баранова (2009), приводит медико-генетические данные, которые показывают, что лишь 1,5% болезней человека вызваны мутациями. Все другие болезни, включая нейropsychические, кардиоваскулярные, раковые и даже инфекционные заболевания, являются мультифакториальными, т.е. результатом комплексного взаимодействия индивидуальных особенностей генома и неблагоприятных внешних факторов, предрасполагающих к развитию болезни у конкретного индивида.

В практической и фундаментальной медицине уже полтора десятка лет назад сформировалось представление о главных и вспомогательных генах, формирующих функциональную генетическую основу мультифакториальных болезней. Более того, эта мысль в иной формулировке получила распространение в виде концепции двойного удара. Первый может быть

связан с формированием индивидуального генома вследствие делеций или дупликаций при неравной рекомбинации в районах хромосомы со специфической архитектурой либо явиться результатом стрессирующего воздействия различной природы на ранних стадиях онтогенеза, второй удар – следствие случайного стечения обстоятельств, вызывающее спорадически болезнь, возникающую не у всех, а лишь у одного из детей здоровых (не обладающих хромосомными перестройками) родителей. Частота их возникновения превышает частоту моногенных мутаций.

В своем исследовании Екатерина Александровна предприняла попытку проследить взаимодействие между различными генными сетями, участвующими в регуляции функциональных процессов мозга в норме и при патологии.

Широко известно, что цитоскелет живой клетки наряду с мембранными компонентами является одной из ведущих базовых структур, обеспечивающих ее морфологическую целостность и функциональную активность. Поэтому любые перестройки цитоскелета отражаются на функциональной активности клетки и могут послужить «толчком» к развитию тяжелых заболеваний, в том числе и нейродегенеративных. Ремоделирование актинового цитоскелета может происходить под влиянием факторов различной природы: факторов роста, межклеточной адгезии и адгезии клеток к субстрату, осуществляемой, главным образом, интегриновыми рецепторами, а также при действии механических сигналов.

Кроме этого, существуют исследования, свидетельствующие об участии актинового цитоскелета и ассоциированных с ним внеклеточных и внутриклеточных белков в процессах проведения сигнала и регуляции экспрессии генов. Однако эти исследования немногочисленны. Таким образом, изучение состояния компонентов сигнального каскада ремоделирования актина на молекулярно-генетическом уровне и на уровне целого организма является **актуальным направлением**, исследование которого позволит приблизиться к более глубокому пониманию процессов,

происходящих с клетками норме и при некоторых патологических состояниях.

Структура диссертации традиционна и содержит введение на 8 страницах, обзор литературы на 149 страницах, описание материалов и методов исследований на 28 страницах, результаты исследования на 154 стр., обсуждение результатов на 17 стр. и, кроме того, заключение, выводы и список условных сокращений. В представленном виде рукопись содержит 460 машинописных страниц текста, 150 рисунков, 26 таблиц, 820 литературных ссылок.

Во **Введении** обосновывается актуальность выбранного направления исследования, формулируются цель и задачи исследования, а также положения, выносимые на защиту, приводится новизна полученных экспериментальных данных, обосновывается их теоретическое и практическое значение.

Обзор литературы достаточно полно отражает современное состояние проблемы и содержит несколько разделов, в которых детально описаны основные концепции патогенеза нейродегенеративных заболеваний. Обзор написан хорошим литературным языком, весьма информативен и характеризует автора как грамотного исследователя.

Нельзя не отметить весьма широкий арсенал адекватных генетических и физиологических **методов исследования**, что является неоспоримым достоинством представленной диссертационной работы. Для изучения вклада кинуренинов в развитие нейродегенеративных заболеваний в работе использовали линии, несущие мутации по кинурениновому пути обмена триптофана; для исследования роли сигнального каскада ремоделирования актина – линии, несущие полиморфизмы по гену *limk1*. Для уточнения роли белков теплового шока (БТШ) в процессах нейродегенерации была использована мутантная линия *l(1)ts403*, дефектная по синтезу БТШ. Применение в исследовании трансгенных линий *RQ1*, *RQ2* и *RQT157*, несущих под *hs*-промоторм дрософилы искусственно созданные,

высокоструктурированные некодирующие РНК – RQ и RQT конструкторы, способствовало выявлению роли некодирующих РНК в нейродегенерации. Изучение терапевтической роли нейротрофических факторов было выполнено на трансгенных линиях *BDNF* и *GDNF*, несущих под *hs*-промотором дрозофилы гены человека для *BDNF* и *GDNF*, соответственно.

В качестве модели для тестирования памяти использовали метод условно-рефлекторного подавления ухаживания, хорошо известный по публикациям А.В. Попова и Е.В. Савватеевой-Поповой. При ухаживании самца за оплодотворенной самкой сочетаются два безусловных стимула – аттрактивный (стимулирующий ухаживание феромон - афродизиак) и аверсивный (подавляющий ухаживание феромон - антиафродизиак). При анализе поведения дрозофилы использовали два подхода: метод условно-рефлекторного подавления ухаживания и регистрации параметров звукопродукции при ухаживании.

Для регистрации локомоторного поведения имаго дрозофилы использована компьютерная программа, разработанная Г.А. Захаровым и Н.Г. Камышевым и оригинальная автоматизированная установка, сконструированная Н.Г. Камышевым с соавторами (Брагина и др., 2007), а также ее вариант, адаптированный для регистрации локомоторного поведения личинок дрозофилы.

Выяснение возможных механизмов поведенческих и неврологических нарушений у исследуемых линий выполнено с помощью иммуофлюоресцентного анализа межлинейных различий распределения LIMK1, p-кофилина, pCREB, БТШ70 в клетках слюнных желез личинок, различных зонах мозга имаго, нейромышечных контактах личинок и торакальной области имаго.

Описания молекулярно-генетических методов: выделения ДНК из *Drosophila melanogaster*, подбор праймеров гена *limk1*, полимеразно-цепной реакции в режиме реального времени, постановки сиквенс-реакции, анализ уровня экспрессии мРНК, выделения белков и электрофорез белков в

полиакриламидном геле, вестерн-блоттинг и блот-гибридизация, биоинформационный анализ представлены в исчерпывающем объеме.

В экспериментальной части работы Екатерина Александровна проводит сравнительное исследование влияния теплового шока и различных мутаций в рецепторной и эффекторной частях сигнального каскада ремоделирования актина на развитие всей триады диагностических признаков, присущих нейродегенеративным заболеваниям. Особое внимание уделяется анализу влияния стрессорных воздействий на уровень LIMK1-киназы и белков системы БТШ. Показана роль BDNF и БТШ90. Полученные результаты позволили автору прийти к выводу, 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 автору удалось показать, что ведущими факторами для развития нейродегенеративных и геномных болезней являются нарушения сигнального каскада ремоделирования актина и микроРНК, способные специфически направлять процессы модификации ДНК и хроматина.

На данный момент в литературе отсутствуют сведения о связи LIMK1 и кофилина с определенными нейрональными подструктурами и/или типами клеток. Методом лазерной конфокальной микроскопии автором была исследована локализация этих компонентов актинового каскада в мозге имаго. Данные по пространственному распределению LIMK1 и кофилина в мозге имаго дрозофилы, представленные в работе, имеют приоритетный характер.

Колокализация р-кофилина с ядрами клеток, следующих вдоль аксонов, позволяет сделать вывод, что большая его часть находится в глии. Под действием ТШ интенсивность окраски анти-р-кофилином снижается (уменьшается количество р-кофилина). р-кофилин перемещается из глии в

аксоны.

Таким образом, у всех исследованных линий р-кофилин очерчивает цитоплазматическую и внутриядерную мембраны, образует трёхмерные тяжи-сети, предположительно повторяя структуру цитоскелета. Различие в окраске у мутантов КПОТ указывает на влияние кинуренинов на распределение и количество р-кофилина. Отсутствие кинуренинов оказывает наибольшее влияние на цитоскелет, поскольку у мутантов *v*, по сравнению с *CS*, увеличивается интенсивность метки и в ядре, и в цитоплазме. Накопление 3-НОК приводит к снижению интенсивности окраски антителами к р-кофилину.

На основании литературных данных и результатов собственных исследований автор приходит к заключению, что новый этап в разработке лечения НДЗ знаменует собой возможность использования подходов генно-клеточной терапии, заключающейся в трансплантации клеток различной природы (дофаминергические нейроны, глиальные клетки - астроциты, фибробласты), в которые предварительно были перенесены функциональные гены ростовых (нейротрофических) факторов или гены ферментов синтеза нейромедиаторов.

В **Обсуждении результатов** полученные данные обобщаются, в краткой форме дается их интерпретация. Этот раздел диссертации логично подводит к **выводам**, которые полностью обоснованы полученными результатами исследования и отражают суть положений, выносимых на защиту.

Достоинством всей диссертационной работы является безупречно выстроенная стратегия исследования, хорошо продуманное последовательное изложение материала.

Представленное Е.А. Никитиной диссертационное исследование, несомненно, обладает **научной новизной**, демонстрируя комплексный физиолого-генетический подход к изучению когнитивных и моторных

функций вместе с иммуногистохимическим анализом распределения компонентов сигнальных каскадов в различных отделах ЦНС дрозофилы.

Оригинальными являются результаты изучения процессов формирования средне- и долгосрочной памяти самцов линий, несущих мутации, затрагивающие различные компоненты генных сетей, участвующих в регуляции функциональных процессов мозга.

Данные о распределении компонентов сигнального каскада ремоделирования актина в различных органах дрозофилы не только сами обладают признаками новизны, но и содержат оригинальные сведения о рCREB-обогащенных нейрональных структурах, возможно, участвующих в формировании долгосрочной памяти при условно-рефлекторном подавлении ухаживания, и новые данные о вненейрональной локализации р-кофилина в области нейромышечных контактов дрозофилы, свидетельствующие о вовлеченности глии в функционирование сигнального каскада актина.

Глубокое направленное исследование структуры и функций LIMK1 позволило получить новые данные об изоформах у линий, проявляющих полиформизм в гене *limk1*, что требует новых подходов при изучении роли LIMK1 в реализации функций ЦНС.

Теоретическая и практическая значимость работы. Комплексный подход к анализу диагностических признаков нейродегенеративных и геномных заболеваний существенно расширяет теоретическое представление о взаимодействии между различными генными сетями, участвующими в регуляции функциональных процессов мозга в норме и при патологии.

Практическая значимость работы заключается в разработке моделей для экспресс-оценки действия различных фармакологических агентов на когнитивные и моторные функции дрозофилы. Разработанные методы можно использовать для поиска лекарственных препаратов, корректирующих триаду диагностических симптомов НДЗ. Большая скорость и сравнительно невысокая цена исследований на дрозофиле делают ее идеальным объектом для предварительного экспериментального тестирования терапевтических

средств. Препараты, прошедшие отбор на такой системе, можно переводить на следующий этап тестирования с использованием позвоночных животных.

Достоверность и обоснованность положений и выводов.

Достоверность представленных в диссертации материалов не подлежит сомнению. Это обусловлено достаточным объемом проведенных экспериментов на больших выборках животных с привлечением современных методов исследований, адекватных выдвинутым задачам, а также грамотно подобранных и корректно примененных методов статистической обработки.

Все результаты, представленные на защиту, получены либо лично диссертантом, либо при его непосредственном участии. По материалам диссертации опубликовано 115 научных работ, включая 16 статей в рецензируемых журналах. Результаты исследований многократно обсуждались на конференциях, конгрессах и симпозиумах всероссийского и международного уровня.

Автореферат полностью отражает основное содержание диссертации.

У меня нет серьезных **замечаний** по сути работы, однако она не свободна от вопросов и редакционных рекомендаций:

1. Обилие аббревиатур в разделе 1.1.4. «Дрозофила как модельная система для исследования нейродегенеративных расстройств» несколько затрудняет восприятие текста, хотя все они представлены в списке сокращений.

2. Встречаются отдельные стилистически не вполне удачные выражения, например, «ухудшение параметров поведения ухаживания», присутствует определенное количество опечаток.

3. Раздел 2.2.4. «Иммуногистохимические методы» главы «Материалы и методы» написан излишне подробно.

После прочтения текста диссертации остается ряд следующих вопросов:

1. Насколько обосновано заключение автора о прогрессирующей потере памяти? В представленных данных анализируется только краткосрочная и долгосрочная формы памяти, но не динамика.
2. Не могут ли быть связаны, выявленные автором, нарушения памяти у Or-R и *agents3*, проявляющиеся в виде нарушения ориентации/преследования, следствием развития двигательных нарушений? Какова на взгляд автора функциональная связь между этими типами расстройств (когнитивными и двигательными)?
3. Хотелось бы узнать мнение автора: выявленное перераспределение транскрипционного фактора p-CREB является следствием или одной из причин развития когнитивных (двигательных) расстройств?
4. Какова возможная функциональная связь сетей трансдукции LIMK1, GDNF и БТШ?
5. Может ли изменение структуры гена *limk1* у *agn^{ts3}* влиять на пространственную организацию ядра?

Высказанные замечания и поставленные вопросы не снижают ценности рассматриваемой диссертационной работы и не снижают высокой положительной оценки работы.

Заключение.

Актуальность тематики диссертационного исследования и научно-практическое значение полученных результатов не вызывает сомнений и следует непосредственно из постановки задач. По своей актуальности, степени обоснованности положений и выводов, достоверности результатов, новизне, научной и практической значимости диссертационное исследование Е.А. Никитиной «Физиолого-генетический анализ механизмов патогенеза нейродегенеративных заболеваний с привлечением моделей на дрозофиле», представленное к защите на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.03.01 – физиология и 03.02.07 - генетика является законченным самостоятельно выполненным научным трудом и открывает новое научное направление в изучении

нейродегенеративных заболеваний, сочетающее молекулярно-клеточные и патофизиологические подходы в моделях на дрозофиле.

Таким образом, 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 медицинских наук, профессор,
заведующий Физиологическим отделом им. И.П. Павлова,
заведующий Лабораторией нейробиологии
интегративных функций мозга
ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»
197376, Санкт-Петербург, ул. акад. Павлова, д. 12
Тел.: 8(812)234-99-37
e-mail: klimenko_victor@mail.ru

29.04.2015.



Клименко Виктор Матвеевич

