

ОТЗЫВ

официального оппонента, зам. директора по научной работе НИИ детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М.Горбачевой, зав. лабораторией молекулярно-биологических исследований отделения клинической микробиологии ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П.Павлова», доктора медицинских наук, профессора Чухловина Алексея Борисовича на диссертационную работу Родина Дмитрия Игоревича: «Изучение функций белка предшественника амилоида и поиск новых антиамилоидогенных препаратов на трансгенных *Drosophila melanogaster*, воспроизводящих основные признаки болезни Альцгеймера», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – «генетика».

Актуальность темы диссертации

Диссертационное исследование Родина Д.И. посвящено изучению молекулярных механизмов, лежащих в основе болезни Альцгеймера (БА) – наиболее распространенной формы возрастной деменции. Это нейродегенеративное заболевание с неясным патогенезом характеризуется прогрессирующей деменцией, сопровождаемой разнообразными когнитивными и физиологическими изменениями. Было показано, что патологические процессы в головном мозге начинают развиваться задолго до проявления основных симптомов заболевания. Несмотря на интенсивные исследования в этой области, до сих пор не ясны причины возникновения морфофункциональных изменений, и, в связи с этим, не разработаны эффективные подходы к терапии. Основными гистопатологическими характеристиками заболевания являются наличие внутриклеточных нейрофибриллярных клубков и внеклеточных отложений, состоящих из агрегированного амилоидного пептида β (A β). Согласно основной гипотезе, именно дисбаланс метаболизма белков, составляющих амилоидные структуры, ассоциирован с возникновением данного заболевания. Кроме того, имеются другие сведения, показывающие, что не только дисбаланс обмена амилоида, но и ряд других процессов могут вносить свой вклад в патогенез болезни. Выявление всех участников процесса и определение ключевых изменений, происходящих на ранних этапах развития заболевания невозможны без лабораторных исследований, проводимых в экспериментальных моделях на лабораторных животных. Одним из наиболее перспективных модельных организмов является *Drosophila melanogaster*. Относительная простота манипуляции с геномом *Drosophila*, короткий жизненный цикл, небольшие размеры и стоимость содержания позволяют проанализировать лежащие в основе БА молекулярные и клеточные механизмы, а наличие у *Drosophila* структурного и функционального аналога гематоэнцефалического барьера млекопитающих делают плодую мушку удобным

объектом для быстрого скрининга разнообразных потенциальных терапевтических агентов.

Цель исследования сформулирована четко и корректно. Основываясь на современных исследованиях патогенеза БА, Д.И. Родин поставил своей целью изучить изменения, вызываемые гиперэкспрессией *APP* в нервной системе трансгенных *Drosophila*, воспроизводящих основные признаки БА. В соответствии с поставленной целью сформулировано четыре задачи исследования, включающих анализ морфологических, экспрессионных и эпигенетических изменений ряда целевых генов, в условиях гиперэкспрессии *APP* в мутантных линиях мух-дрозофил, а также оценку антиамилоидогенного и нейропротекторного действия красного пигмента дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Кроме того, соискатель, используя трансгенных животных, проанализировал возможные антиамилоидогенные свойства красного пигмента дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.

Научная новизна

В работе впервые продемонстрировано влияние гиперэкспрессии гена *APP* на развитие *Dr. melanogaster*. Показано, что нарушение экспрессии *APP* может независимо от $A\beta$ приводить к морфологическим аномалиям развития мух. Кроме того, оценено влияние как *APP* и его форм, так и $A\beta_{42}$ на транскрипционные изменения генов пресинаптических белков синаптоагмина и нейронального синаптобревина в мозге *Dr. melanogaster*. Автором впервые показано, что гиперэкспрессия *APP* вызывает изменение статуса метилирования гена пресинаптического белка синаптоагмина-1. Впервые *in vivo* продемонстрирован позитивный эффект потребления дрожжей-продуцентов красного пигмента на содержание токсичной фракции $A\beta_{42}$, а также на когнитивные функции *Drosophila* с экспрессией последовательности, кодирующей пептид $A\beta_{42}$.

В ходе работы автором впервые показаны ингибирующий эффект красного пигмента дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* на накопление патологического амилоида *in vivo*. Продемонстрированы его нейропротекторные свойства, проявляющиеся в виде уменьшения нейродегенерации и восстановления когнитивных свойств трансгенных животных.

Теоретическое значение работы

Проведенное автором исследование роли основных генов, участвующих в патогенезе БА, анализ первичных транскрипционных и эпигенетических изменений в

связи с конкретными морфологическими аномалиями и патологическим отложением $A\beta$ в головном мозге, имеют фундаментальное значение для нейробиологии, в плане раскрытия механизмов начальных нейродегенеративных нарушений при БА.

Практическая значимость работы

Научно-практическая значимость полученных результатов несомненна, с перспективой применения экспериментальной модели дрозофилы, трансгенной по *APP* и/или *A β* , для разработки новых методов диагностики БА, скрининга биологически активных соединений в фармакологии и экспериментальной геронтологии.

Достоверность и обоснованность

Результаты проведенного исследования полностью отражены в автореферате и 9 опубликованных работах, 4 из которых - в журналах, рекомендуемых ВАК. Достоверность результатов и выводов диссертационного исследования Д.И.Родина обеспечена достаточным количеством проведенных экспериментов, а также применением современных методов статистики для оценки влияния индивидуальных генетических факторов. В работе был использован широкий спектр методов морфологического анализа (в т.ч. конфокальная микроскопия), современные методики белковой химии и real-time ПЦР, автор лично принимал участие в получении экспериментальных результатов, анализе полученного массива данных. Научные положения, выводы и рекомендации, сформулированные в диссертации, основаны на достаточном по объему экспериментальном материале, верифицированы различными уточняющими методами и поэтому их обоснованность не вызывает сомнений.

Содержание и оформление диссертации

Диссертационная работа Д.И.Родина написана по традиционному плану. Она включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, результаты и обсуждение, 25 рисунков, 5 таблиц, заключение, выводы и список литературы, содержащий 161 источник. Работа изложена на 104 страницах.

Обзор литературы содержит анализ литературы по вопросам, решаемым в диссертации. Автор касается общих аспектов и социальной значимости болезни Альцгеймера (БА), указывает на отсутствие надежных диагностических тестов на БА. Отдельно рассматриваются причины отложений амилоидного пептида ($A\beta$) в головном мозге пациентов. Определенный интерес вызывает раздел, посвященный модулирующим

свойствам Аβ в процессах фосфорилирования, а также модификации эффектов нейромедиаторов.

Рассматривается каскад протеазных реакций, ведущих к накоплению Аβ, в т.ч. его токсичных фракций. Особо рассматриваются возможные генетические факторы развития БА, в частности мутации *APP*, *PSEN-1* и *PSEN-2*, выявленные при семейных формах заболевания. Обсуждается также возможная роль других генных мутаций как модифицирующих факторов обмена Аβ. Очень кратко упоминается о возможности эпигенетических влияний на процессы формирования БА.

Обзор литературы включает также краткие сведения о современной терапии БА и перспективных препаратах, в т.ч. попытках антиамилоидогенных воздействий. В связи с этим поставлен вопрос о необходимости внедрения простых моделей для оценки *in vivo* протективных эффектов потенциально активных препаратов против БА (в том числе линии мух-дрозофил с аномальной экспрессией человеческого *APP* и отложениями Аβ).

В разделе «Материалы и Методы» подробно описаны использованные линии дрозофил с экспрессией нормального и мутированного *APP*, а также методы морфологической оценки мутаций, процедура выделения РНК определение мРНК *sytl*, *n-syb*, *psn*, оценка статуса метилирования *sytl* и *n-syb*. Описываются также методики оценки выживаемости и локомоторной активности насекомых, способы обычной и конфокальной микроскопии тканей головного мозга с целью выявления отложений патологических белков. Заслуживает внимания применение Вестерн-блоттинга для определения содержания Аβ в мозге.

В третьей главе диссертации представлены собственные результаты исследования. В разделе 3.1 описаны обнаруженные аномалии развития *Drosophila*, ассоциированные с гиперэкспрессией гена *APP* и с накоплением Аβ, в частности - развитием дефектов нервной ткани. Показан эффект дозы *APP*, выражающийся в более раннем развитии патологии, а также повышенная летальность особей с различными мутациями *APP* и отложениями Аβ. Описываются многочисленные морфологические аномалии у мух с мутациями *APP*. В результате проведенных исследований Родин Д.И. убедительно показал, что гиперэкспрессия *APP* и его мутантных форм в *Drosophila melanogaster* вызывает появление разнообразных морфологических аномалий имаго. У мух, в которых происходит образование Аβ, количество аномалий существенно снижено, т.е. очевидно, что обнаруженные патогенные эффекты *APP* не зависят от образования его токсичного продукта Аβ. В результате проведенных исследований Родин Д.И. убедительно показал,

что гиперэкспрессия *APP* и его мутантных форм в *Drosophila melanogaster* вызывает появление разнообразных морфологических аномалий имаго. У мух, в которых происходит образование $A\beta$, количество аномалий существенно снижено, т.е. очевидно, что обнаруженные патогенные эффекты от накопления *APP* не зависят от образования его токсичного продукта $A\beta$.

В разделе 3.2 описаны результаты оценки экспрессии генов синаптических белков *sytl* и *n-syb* у контрольных и мутантных особей. При анализе различных вариантов трансгенов удалось дискриминировать эффекты. Важно то, что исследования экспрессии генов *n-syb*, *sytl*, *psn* проводились в разные периоды жизни особей, что позволило более достоверно оценить их связи с изменениями экспрессии *APP*.

В разделе 3.3 приведены данные об уровнях метилирования ДНК промоторных участков синаптических белков в зависимости от типа мутаций, ведущих к гиперэкспрессии *APP* и образованию $A\beta$.

Раздел 3.4 посвящен биологическим эффектам «красного пигмента» дрожжевых клеток на мутантных мух-дрозофил с экспрессией токсичного пептида $A\beta_{42}$. Эти опыты основаны на известных антиамилоидных свойствах красного пигмента. Показано, что в мухах, потреблявших в пищу «красные» дрожжи, относительное содержание растворимой фракции $A\beta_{42}$ было значительно пониженным, в этих условиях были снижены и проявления нейродегенеративных процессов, отмечалась более высокая локомоторная активность.

Выводы в диссертации составлены корректно. Они естественно вытекают из материалов проведенного исследования, а их достоверность, подкрепленная детальной статистической обработкой данных, не вызывает никаких сомнений. Выводы, содержащиеся в автореферате диссертации, соответствуют результатам и выводам в диссертационной работе.

Принципиальных замечаний к работе нет. Однако имеются некоторые дискуссионные вопросы:

1. Желательно знать, является ли оригинальной схема патогенеза БА на рис. 3 (с.22).
2. Предположения о возможной роли TLR и воспалительных механизмов в генезе морфологических нарушений (С.60-61) представляются весьма отвлеченными, тем более что не связаны непосредственно с собственными результатами. Несмотря на

гомологию TLR, насколько сопоставимы механизмы иммунной регуляции у насекомых и млекопитающих?

Высказанные замечания не влияют на общую положительную оценку диссертационной работы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

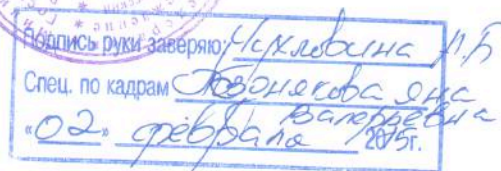
По актуальности, уровню новизны и достаточному объему проведенных исследований, диссертационная работа Родина Дмитрия Игоревича «Изучение функций белка предшественника амилоида и поиск новых антиамилоидогенных препаратов на трансгенных *Drosophila melanogaster*, воспроизводящих основные признаки болезни Альцгеймера», выполненная под руководством доктора биологических наук Саранцевой С.В., является законченной научно-квалификационной работой, имеющей существенное значение для развития общей и прикладной генетики и соответствует требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. №842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – «генетика».

Зам. директора по научной работе НИИ детской
онкологии, гематологии и трансплантологии
им. Р.М.Горбачевой, зав. лабораторией
молекулярно-биологических исследований отделения
клинической микробиологии ГБОУ ВПО
«Первый Санкт-Петербургский государственный
медицинский университет им. И.П.Павлова»,
доктор медицинских наук, профессор

А. Чухловин



Алексей Борисович Чухловин



Адрес: 197022, Санкт-Петербург, ул. Л.Толстого, д.6-8

Тел: +7 (812) 499 7079, Факс: +7 (812) 232 4649, E-mail: alexei.chukh@mail.ru