

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Дарьи Игоревны Козловой «Изучение свойств и регуляции металлопептидазы неприлизина в мозге и плазме крови млекопитающих», представленной к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия, 03.03.01 – физиология.

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Изучение механизмов старения организма и развитие патологических состояний является одной из актуальных проблем современной медицины. В настоящее время усилия ученых биологов и медиков сосредоточены на выяснении молекулярных механизмов развития болезни Альцгеймера, поиск специфических маркеров с целью выявления заболевания на ранних стадиях, разработки эффективных методов лечения. Представленная диссертационная работа посвящена одной из актуальных проблем, связанных с изучением свойств и регуляции металлопептидазы неприлизина - одного из основных ферментов, участвующих в деградации β -амилоида.

Исследования последних лет сфокусированы на анализе протеолитических ферментов, осуществляющих протеолиз β -амилоида, что препятствующих его накоплению в ткани мозга. Исходя из актуальности данной проблемы, автор останавливается на изучении свойств и механизмов регуляции металлопептидазы неприлизина (НЕП), одного из самых мощных амилоид-деградирующих ферментов в организме. В будущем это позволит подойти к разработке новых терапевтических подходов к своевременному лечению болезни Альцгеймера и оценки его эффективности. Особенно актуальным и ценным является изучение свойств и регуляции НЕП в структурах мозга и плазме крови крыс в норме и после перенесенной пренатальной гипоксии, приводящей к снижению когнитивных функций в процессе развития и жизнедеятельности животных. Автором было выявлено наличие сходных изменений НЕП в плазме крови больных на ранней стадии развития БА и продемонстрирована зависимость между уровнем снижения активности НЕП в плазме крови пациентов и степенью развития у них деменции. Это направление данной диссертационной работы является особенно актуальным, поскольку открывает возможность использования показателя активности НЕП в качестве маркера ранних изменений, приводящих к нейродегенерации и БА у больных. Последующее изучение молекулярных механизмов регуляции экспрессии гена НЕП и модуляции активности этого амилоид-деградирующего

фермента открывает новые перспективы в поиске терапевтических агентов, способных изменять экспрессию гена НЕР при патологических состояниях.

Автором четко сформулирована **цель** работы: «исследование изменений содержания и активности НЕР в нервной ткани и плазме крови млекопитающих в норме, при развитии когнитивных дисфункций (у крыс после пренатальной гипоксии или у человека при нейродегенеративных заболеваниях), изучение механизмов регуляции экспрессии НЕР с использованием клеточной (нейробластома человека NB7) и зоотропной (крысы) моделей».

Задачи представленной диссертации логично вытекают из поставленной автором цели.

Научная новизна исследования.

Научная новизна диссертации не вызывает сомнения. В работе впервые проанализирована динамика изменения активности НЕР в разных структурах мозга в процессе постнатального развития крыс в норме и после пренатальной гипоксии на E14, обнаружена связь между уровнем снижения активности НЕР и изменением когнитивных функций. Впервые выявлена разнонаправленность в изменении активности НЕР в структурах мозга и плазме крови крыс в постнатальном развитии в норме и при патологии.

Диссертантом впервые проведено исследование возможных молекулярных механизмов регуляции экспрессии и активности НЕР при действии гипоксии. Впервые установлена корреляционная зависимость между снижением уровня связывания активирующего транскрипционного фактора АICD с промотором гена НЕР и повышением уровня экспрессии и активности каспаз в клетках нейробластомы человека NB7. Впервые выявлено положительное действие введение ингибитора каспаз как в клетках нейробластомы, так и в мозге крыс после пренатальной гипоксии на E14, сопровождающее улучшением их когнитивных функций.

Автор получены убедительные доказательства наличия корреляции между уровнем снижения активности НЕР и степенью выраженности когнитивных нарушений у больных, показано положительное влияние на активность НЕР используемой при БА лекарственной терапии.

Теоретическая и практическая значимость работы

Работа имеет большое научно-практическое значение, так как представленные Дарьей Игоревной данные позволяют расширить наши представления о возможных молекулярных механизмах регуляции экспрессии гена НЭП при гипоксии. Выявлена связь между экспрессией и активностью каспаз, транскрипционным фактором AICD, который является субстратом каспаз, и промотером гена НЭП.

Показано, что применение ингибитора каспазы-3 у крыс, перенесших гипоксию на E14, приводит к восстановлению содержания AICD и активности НЭП до контрольных значений, улучшению процессов запоминания и обучения животных. Полученные диссертантом данные открывают новые перспективы в поиске мишеней для регуляции экспрессии и активности НЭП и других нейрональных генов с целью коррекции патологических изменений поведенческих реакций, памяти и обучения при нарушении развития организма.

Результаты анализа показателей активности НЭП в плазме крови человека могут быть использованы в практической медицине в качестве одного из диагностических тестов, который позволит оценить степень развития патологических изменений и эффективность применяемой лекарственной терапии при наличии амнестического типа мягкого когнитивного снижения (а-МКС) или БА у пациентов с нарушениями внимания и памяти.

Степень достоверности и апробации результатов работы. Автором представлены четкие доказательства достоверности полученных результатов, обеспеченных разнообразием и адекватностью применяемых методов, их воспроизводимостью, сертифицированностью оборудования и реактивов, личным участием во всех экспериментах, публикацией материалов диссертации в ведущих отечественных и зарубежных научных журналах, представлением материалов работы в виде устных и стендовых докладов на российских и международных научных форумах.

Оценка содержания работы и ее завершенность.

Изложение текста диссертации представлено в традиционном стиле, и его оформление соответствует действующим правилам. Диссертация включает в себе введение, обзор литературы, описание материалов и методов, результаты и обсуждение, заключение, выводы и список используемой литературы.

В вводной части диссертации четко сформулирована актуальность и новизна разрабатываемой темы, отражена фундаментальная значимость в изучении свойств и регуляции НЭП в структурах мозга и плазме крови крыс в норме и после пренатальной гипоксии, в плазме крови человека при БА. Четко отмечено научно-практическое значение полученных данных, которые могут быть использованы в качестве дополнительного диагностического критерия для подтверждения диагноза а-МКС или БА у пациентов с нарушениями внимания и памяти, а также для оценки эффективности действия лекарственных препаратов.

Литературный обзор охватывает большой объем материала, что свидетельствует о глубоком и всестороннем знании изучаемой автором проблемы. Д.И. Козловой критически, в сжатой форме всесторонне проанализировано современное состояние научных достижений и существующих в настоящее время современных методов биохимических, молекулярно-клеточных и физиологических исследований, что находит в дальнейшем свое отражение в представленной экспериментальной части диссертационной работы. Литературный обзор написан хорошим литературным языком и читается с большим интересом.

Экспериментальная часть диссертации выполнена на высоком методическом уровне с использованием современной аппаратуры и современных методов. Раздел диссертации «**Материалы и методы исследования**» включает перечень оборудования и материалов, используемых в работе, описание условий содержания животных и проведение исследований и сами методы исследования. Автором подробно описаны используемые экспериментальные и компьютерные методы. Следует отметить большой объем представленных в диссертации современных методов, что позволяет диссертанту провести глубокий и всесторонний анализ полученных результатов, оценить их фундаментальную значимость при изучении свойств и регуляции НЭП в мозге и плазме животных и способствует цельному восприятию последующей экспериментальной части диссертации. Параллельно была обследована большая группа людей с диагнозом БА и при наличии мягкого когнитивного снижения амнестического типа.

Следует отметить логическое и научно обоснованное построение экспериментальной части работы. Первая часть экспериментальных исследований диссертации посвящена изучению активности и экспрессии НЭП в теменной коре и гиппокампе мозга в постнатальный период развития контрольных крыс и крыс после пренатальной гипоксии. Автором четко показано снижение активности и экспрессии НЭП

в обеих группах крыс в процессе их развития, которое наиболее выражено у животных после пренатальной гипоксии. Параллельно Дарья Игоревна отмечает изменение когнитивных функций после пренатальной гипоксии и в процессе старения животных, проявляющееся в ухудшение процессов обучения и кратковременной и долговременной памяти. Совершенно обосновано автор считает, что одной из причин нарушения когнитивных функций мозга может быть снижение уровня экспрессии и активности металлопептидаз, в частности НЕП, участвующих в метаболизме амилоидного пептида А β . В последующих исследованиях Дарья Игоревна логично переходит к выяснению возможных механизмов регуляции экспрессии и активности НЕП с использованием клеток NB7. Автором было показано, что в условиях гипоксического воздействия наблюдается не только снижение активности НЕП и его экспрессии, но и изменение перераспределения его в клетке. Диссертантом выдвигается предположение, что причиной выявленных изменений является снижение связывания транскрипционного фактора AICD с промотором гена НЕП вследствие его деградации каспазами. Подтверждением этого предположения является защитное действие ингибитора каспазы-3 при гипоксии, которое проявляется в увеличении экспрессии и активности НЕП. Введение ингибитора каспазы-3 приводило также к улучшению поведенческих реакции у животных.

Полученные экспериментальные данные позволяют автору прийти к заключению, что регуляция активности и экспрессии НЕП может обеспечить нормальное функционирование организма в процессе старения организма и после пренатальной гипоксии, а также о том, что дефицит активности НЕП может быть одним из факторов, приводящих к развитию БА. Автор логично обосновывает особую роль в нарушении метаболизма А β каспазы-3, которая помимо ее участия в процессах апоптоза может приводить к снижению экспрессии и активности А β -деградирующего фермента НЕП. Изменение уровня активности каспазы-3 отражается на снижении или восстановлении когнитивных функций. Дарьей Игоревной впервые показано, что в ткани мозга крыс при гипоксии процесс регуляции НЕП осуществляется посредством AICD, что расширяет имеющиеся представления о функциональной роли этого регуляторного механизма. Введение крысам, перенесшим пренатальную гипоксию, вальпроата натрия - ингибитора гистондеацетилаз приводит не только к повышению активности НЕП в теменной коре и гиппокампе по сравнению с животными, которым вводили физраствор, но и к улучшению краткосрочной и долговременной памяти.

Полученные автором данные имеют большое научно-практическое значение, так как расширяют наши представления о роли молекулярных процессов, обеспечивающих поддержания экспрессии и активности этого фермента на необходимом физиологическом уровне при разработке терапевтических стратегий, направленных на улучшение состояния пациентов с а-МКС или БА. Так как в настоящее время НЕП рассматривают в качестве одно из основных ферментов, участвующих в регуляции уровня амилоидного пептида в мозговой ткани, соответственно дефицит НЕП связывают с риском развития БА у людей пожилого возраста. Автором впервые было выявлено снижение активности фермента в плазме крови пациентов с диагнозом мягкого когнитивного снижения амнестического типа и БА, показано наличие зависимости между степенью выраженности когнитивных нарушений и уровнем снижения активности НЕП. Лечение больных Цераксоном приводило к нормализации активности фермента. Все это позволяет рассматривать НЕП в качестве одного из диагностических тестов на ранних стадиях БА, а также использовать для оценки эффективности проводимой лекарственной терапии. Это еще раз подчеркивает научно-практическую значимость и перспективность полученных данных при разработке терапевтических подходов для профилактики и лечения БА.

Большой интерес представляет раздел диссертации «Обсуждение», где Д.И. Козлова проявила свое научное видение изучаемой проблемы, умение провести всесторонний и логично обоснованный анализ полученных результатов с учетом современных литературных данных. Автором впервые получены приоритетные данные, отражающие динамику изменения активности и экспрессии НЕП в тканях мозга и плазмы в процессе онтогенеза здоровых крыс и после перенесенной пренатальной гипоксии. При анализе поведенческих тестов была выявлена корреляционная зависимость между полученными биохимическими изменениями и когнитивными функциями. Диссертантом на основании полученных данных сформулировано четкое представление о возможных механизмах выявленных биохимических и поведенческих изменений при гипоксии и старении организма, обусловленных уменьшением связывания фактора транскрипции AICD с промотором гена НЕП, восстанавливающее действие на которое оказывают ингибиторы каспаз и ингибирование гистондеацетилаз. Все это позволяет более углубленно подойти к проблемам своевременной диагностики АБ и других психоневрологических заболеваний, протекающих с когнитивными нарушениями, а также к разработке новой стратегии в назначении лекарственной терапии.

Выводы представленной работы обоснованы и логично вытекают из полученных автором результатов работы.

Таким образом, представленная диссертация является завершенной научно-исследовательской работой, с четкой трактовкой полученных экспериментальных данных, глубоким их анализом. Автором получены приоритетные данные, характеризующие динамику экспрессии и активности металлопептидазы НЕП в ткани мозга и крови крыс, а также раскрывающие молекулярные механизмы регуляции экспрессии НЕП в онтогенезе млекопитающих в норме и при патологии, и их значимости при развитии болезни Альцгеймера у пожилых людей.

Вопросы и замечания по рецензируемой работе.

1. Вы совершенно обосновано связываете снижение активности НЕП в процессе постнатального развития со снижением его экспрессии. Не могли ли бы попытаться объяснить значимость этого снижения с функциональных позиций, с позиций роли НЕП в регуляции токсического амилоидного пептида в организме, его роли в поражении мозга при старении. И исходя из этого Ваше мнение о физиологической роли амилоидного белка в организме, которое высказывается отдельными учеными.

2. Чем вы объясняете однотипную динамику изменения НЕП у здоровых крыс и крыс после перенесенной гипоксии, имеет ли это какое-то физиологическое значение при развитии организма?

3. Чем обоснован выбор именно пренатальной гипоксии в качестве модели гипоксии? Почему не использовалась модель гипоксии на взрослых животных, ведь в дальнейшем Вы много внимания уделяете исследованиям старых животных и людей с БА?

4. Принимая во внимание, что система каспаз находится в неактивном состоянии и включение ее осуществляется за счет действия многих факторов в норме и при патологических состояниях, в частности, при нейродегенеративных заболеваниях, не могли ли вы осветить возможную связь между метаболизмом амилоидного белка и его функцией, каспазами и состоянием окислительного стресса, на фоне которого осуществляются эти процессы.


Высказанные замечания и вопросы носят сугубо дискуссионный характер и их следует рассматривать в качестве пожеланий для последующего развития исследований.

Заключение

Диссертация Козловой Дарьи Игоревны является завершенной самостоятельной научно-исследовательской работой, с четкой трактовкой полученных экспериментальных данных, глубоким их анализом. Полученные автором данные имеют большое научно-практическое значение, расширяют наши представления об особенностях регуляции неприлизина в процессе созревания организма, открывают новые перспективные возможности в области своевременной диагностики и разработки лекарственной терапии при состояниях гипоксии и БА.

Диссертационная работа Дарьи Игоревны Козловой «Изучение свойств и регуляции металлопептидазы неприлизина в мозге и плазме крови млекопитающих», представленной к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия, 03.03.01 – физиология. Представленная к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия, по актуальности темы, научной новизне, высокому методическому уровню исследований, объему выполненных исследований, практической значимости полученных результатов, по разработке новых теоретических положений 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 биологических наук, а ее автор заслуживает присуждение искомой ученой степени.

Главный научный сотрудник отделения
клинической и лабораторной диагностики,
нейрофизиологии и нейровизуальных исследований
доктор медицинских наук (03.01.04 – «Биохимия»,
14.01.08 – «Педиатрия»), профессор



Дубинина Елена Ефимовна



Психоневрологический институт
им. В.М. Бехтерева
ул. Бехтерева, 3, 192019, Санкт-Петербург,
(812) 670-02-26,
Электронная почта: eedubinina@rambler.ru