

ОТЗЫВ

официального оппонента о диссертации Козловой Дарьи Игоревны
**«ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ И РЕГУЛЯЦИИ МЕТАЛЛОПЕПТИДАЗЫ
НЕПРИЛИЗИНА В МОЗГЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ»**,
представляемой на соискание ученой степени кандидата биологических наук по
специальностям

03.01.04 – биохимия, 03.03.01 – физиология.

Актуальность. Диссертационное исследование Козловой Д.И. посвящено актуальному вопросу – изучению свойств и регуляции недавно открытого амилоид-деградирующего фермента неприлизина. Следует отметить, что несмотря на интенсивные исследования в этой области, нейродегенеративные заболевания (НДЗ), в особенности болезнь Альцгеймера, получают все большее распространение по причине того, что до сих пор не найдено эффективных средств для их профилактики и лечения. В последние годы одним из наиболее перспективных направлений в отношении разработки таких стратегий считалось направленное воздействие на метаболизм белка-предшественника бета-амилоида (APP). В частности, на стимуляцию альфа-секретазного процессинга, в результате которого, как известно, не происходит образования токсичных бета-амилоидных олигомеров. Однако развитие современных представлений о биохимических основах нейродегенерации показало, что такой подход к лечению болезни Альцгеймера вряд ли можно считать перспективным. Для нормального обеспечения физиологических процессов необходимо чтобы активность альфа- и бетасекретазных путей метаболизма APP была тонко сбалансирована. Прорывное значение для выявления ключевых точек нейродегенерации и нейропротекции имело недавнее открытие способности металлопептидазы неприлизина (НЕП) разрушать токсичный бета-амилоидный пептид. Специалисты полагают, что именно НЕП может представлять собой наиболее перспективную мишень для эффективных терапевтических воздействий, однако до настоящего времени о свойствах и регуляции НЕП известно очень мало. Именно этому вопросу и посвящена диссертационная работа Д.И.Козловой, поэтому ее актуальность, своевременность и значимость для здравоохранения очевидна.

Научная новизна. Впервые выявлена корреляция между возрастным снижением активности и экспрессии неприлизина в мозге и выраженностью когнитивных нарушений в процессе старения. Получены факты, впервые раскрывающие значительную роль гипоксического фактора в развитии когнитивных нарушений и

патогенезе болезни Альцгеймера, а также установлены некоторые важнейшие механизмы данного эффекта, связанные с регуляцией неприлизина. Показано, что ингибитор каспазы-3 способствует восстановлению активности неприлизина в гипоксических условиях путем повышения уровней AICD, что может иметь значение для предотвращения проявления негативных эффектов гипоксии. Впервые установлено, что активность и регуляция неприлизина в мозге и плазме крови изменяется разнонаправлено.

Теоретическое значение работы определяется полученными фундаментальными сведениями о механизмах регуляции НЭП, в частности при действии таких повреждающих факторов как гипоксия. Эти принципиально новые сведения в значительной степени расширяют современные представления о функциональной роли НЭП в нейродегенерации и нейропротекции.

Практическое значение. Полученные в работе фундаментальные данные указывают на новые возможные терапевтические мишени для лечения НДЗ, связанные с направленными воздействиями на экспрессию НЭП. Кроме того, показано, что активность НЭП в плазме крови может использоваться в качестве маркера диагностики болезни Альцгеймера на ранних стадиях патогенеза. Впервые продемонстрирована эффективность препарата цераксона в отношении нормализации активности НЭП и улучшения когнитивных показателей у пациентов с мягкими формами деменции, что будет способствовать расширению применения данного препарата в клинике. Несомненную практическую ценность имеет налаженный в работе новый метод – метод определения активности НЭП в плазме крови, который вне всякого сомнения будет востребован для применения в экспериментальной и клинической практике.

Материал диссертации изложен ясно, диссертация хорошо структурирована и оформлена. Работа изложена на 140 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, изложения материалов и методов исследования, собственных результатов исследования, обсуждения результатов, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа иллюстрирована 29 рисунками и 1 таблицей. По объему соотношение разделов в диссертации сбалансировано.

Во Введении емко и логично излагается суть изучаемой проблемы, ее актуальность и значимость для фундаментальной науки и практической медицины.

Исходя из современного уровня знаний, обосновывается актуальность выбранного направления диссертационного исследования, формулируются цели и задачи. Следует заметить, что порядок изложения материала во Введении несколько отличается в диссертации и автореферате. С моей точки зрения, вариант Введения, представленный в диссертации, наиболее удачен. К некорректным формулировкам можно отнести фразу «Данная диссертационная работа посвящена изучению свойств и регуляции НЕП в структурах мозга и плазмы крови крыс в норме и после пренатальной гипоксии». Безусловно, это один из основных фрагментов работы, однако подобная формулировка умаляет значимость других интересных и важных разрабатываемых аспектов, в частности относящихся к исследованиям на клеточной модели нейробластомы или клинических образцах плазмы.

Целью настоящей работы явилось исследование уровня, активности и регуляции НЕП в норме и патологии в нескольких *in vivo* и *in vitro* моделях. Цель сформулирована Д.И.Козловой лаконично и корректно. Для достижения цели поставлено 8 конкретных задач исследования, соответствующих цели. Следует отметить, что задач достаточно много, однако это абсолютно оправдано и связано с масштабностью проведенных исследований. Положения, выносимые на защиту, сформулированы хорошо, они отражают основные концептуальные выводы работы.

В Обзоре литературы приводится развернутое описание современных представлений о функциональной роли протеолитических ферментов в норме и при развитии НДЗ. Большое внимание уделено механизмам регуляции амилоид-деградирующих ферментов и, в особенности НЕП. Кроме того, обсуждается роль различных патогенных факторов, и прежде всего гипоксии. При чтении Обзора литературы становится очевидным, что автор обладает глубочайшими и обширными знаниями круга проблем и литературы по избранной тематике. Хочется отметить, что порядок изложения материала в Обзоре очень последователен и логичен. Сначала активно обсуждается физиологическая роль протеолитических ферментов в целом, затем внимание читателя фокусируется на одном из важнейших протеолитических ферментов – НЕП, его известных к настоящему времени свойствах и функциях. Далее на первый план выводится такой ключевой аспект как амилоид-деградирующая активность НЕП и молекулярно-генетические и биохимические механизмы регуляции его экспрессии. В связи с тем, что одним из повреждающих факторов, наиболее часто приводящим к развитию нейропатологий, является гипоксия/ишемия, значительное место в работе занимают исследования

экспрессии и активности НЕП в моделях гипоксических повреждений (пренатальная гипоксия, гипоксия *in vitro*). Поэтому в главе 1.6.4 приводятся сведения о происходящих при гипоксии ключевых молекулярно-клеточных процессах. Однако название данной главы («Гипоксия как фактор, влияющий на изменение экспрессии неприлизина») не вполне отражает ее содержание, поскольку в тексте нет ни слова про НЕП и роль гипоксических факторов в регуляции его экспрессии и активности. Дело в том, что до исследований Д.И.Козловой этот вопрос был совершенно неизучен, а тот факт, что повреждающая гипоксия действительно дифференциально регулирует НЕП в мозге и плазме, получен впервые в диссертации Д.И.Козловой. Поэтому в Обзоре литературы подобное влияние можно лишь предполагать. Последние главы Обзора литературы вводят читателя в курс неврологических нарушений в ходе развития болезни Альцгеймера и логично подводят к необходимости поиска маркеров ранней его диагностики. Удачной находкой автора является подраздел Заключение в Обзоре литературы, концептуально обобщающий изложенное в Обзоре современное состояние проблемы и выполняющий роль логического обоснования целей работы и предложенных экспериментальных подходов.

Во второй главе «Материалы и методы» изложены общая характеристика разнообразного экспериментального материала, от крыс и проб крови пациентов до клеточных культур, а также обширный арсенал экспериментальных методов, использованных в работе, от анализа поведенческих показателей до ультрасовременных методов молекулярной биологии и генетики. В общей сложности в работе использован 21 метод, включая физиологические, биохимические, молекулярно-биологические, иммуногистохимические и пр. Все это свидетельствует о высочайшем методическом уровне, на котором выполнены исследования Д.И.Козловой, что безусловно является большим достоинством диссертационной работы. Из мелких недочетов – не хватает информации о том, через сколько времени после поведенческих тестирований животных декапитировали, а также в течение какого промежутка времени происходило снижение содержания кислорода от нормоксии до гипоксии (7%). После прочтения описания методов математической статистики возникает вопрос – какой все-таки критерий был использован для обработки биохимических данных – дисперсионный анализ ANOVA или t-критерий Стьюдента? В первом предложении данной главы (2.23) указывается, что обработку проводили с помощью программы Excel «с надстройками для проведения

дисперсионного анализа ANOVA», однако далее упоминаются только t-критерий Стьюдента и критерий Манна-Уитни (для поведенческих исследований).

В следующем разделе работы приведены результаты собственных исследований. В частности, при анализе особенностей возрастной динамики НЭП в неокортексе и гиппокампе крыс выявлено постепенное снижение активности данного фермента с возрастом в неокортексе и резкое (на 20-й день постнатального онтогенеза) но устойчивое снижение – в гиппокампе. Гипоксия, перенесенная в пренатальный период, способствовала снижению активности НЭП и когнитивным нарушениям у животных. В отдельных экспериментах доказано, что снижение активности НЭП происходит за счет подавления экспрессии данного белка. Негативный эффект гипоксии на активность и экспрессию НЭП также был воспроизведен *in vitro* на культуре клеток нейробластомы человека. Был выявлен механизм, за счет которого вероятно реализуется данный эффект, а именно - установлено, что снижение экспрессии и активности НЭП связано с уменьшением содержания в клетках AICD, являющегося ключевым регулятором НЭП. Установлено, что параллельно со снижением НЭП гипоксия вызывает активацию про-апоптотических каспаз, которые в свою очередь вовлечены в расщепление AICD. При этом применение ингибитора каспазы-3 способствовало восстановлению активности НЭП в нейронах путем стабилизации уровней AICD, и улучшению поведенческих характеристик после гипоксии. Неспецифический ингибитор гистоновых деацетилаз вальпроат натрия также восстанавливал активность НЭП, подавленную гипоксией, что выявляет роль эпигенетического уровня регуляции в реализации эффектов гипоксии на НЭП. Все эти новые сведения раскрывают возможную патогенетическую роль гипоксического фактора в развитии НДЗ и впервые проясняют лежащие в основе конкретные биохимические механизмы.

Отдельный кластер исследований относился к мониторингу активности НЭП в плазме крови в различных экспериментальных условиях. Результаты и их сравнительный анализ с данными первой части работы, относящейся к активности данного фермента в мозге, показали как общие, так и специфические изменения. В отличие от мозга, выявлена двухфазная динамика активности НЭП в плазме крови, с минимумом на 20-й день онтогенеза. Кроме того, пренатальная гипоксия вызывала не снижение, а, напротив, повышение активности НЭП в плазме. Однако в образцах крови пациентов с когнитивными нарушениями наблюдалось статистически достоверное снижение активности НЭП, коррелирующее со степенью развития

деменции и когнитивным дефицитом. Эти сведения могут иметь практическое значение для разработки биохимических критериев ранней диагностики болезни Альцгеймера.

Экспериментальные данные изложены детально и хорошо проиллюстрированы рисунками. Обращает на себя внимание прекрасное качество представленных фотографий флуоресцентной конфокальной микроскопии, что безусловно еще раз доказывает высочайший методический уровень, на котором проведены эти исследования.

Экспериментальные данные, лежащие в основе диссертационного исследования Д.И. Козловой, получены на большом объеме животных, с использованием обширного арсенала ультрасовременных методов, адекватных поставленным задачам, достоверность представленных в диссертации материалов не вызывает сомнений.

Раздел Обсуждение содержит всесторонний анализ и осмысление полученных результатов, в том числе и в свете литературных данных.

Завершается диссертационная работа Заключением, где суммированы и концептуально представлены основные результаты работы. Заключение логично подводит читателя к выводам, которые корректно отражают основные результаты работы и соответствуют задачам.

Основные результаты диссертационного исследования Д.И.Козловой опубликованы в рецензируемых журналах, рекомендуемых ВАК РФ, и широко обсуждались на конференциях и симпозиумах, в том числе и за рубежом. По теме диссертации опубликовано 18 печатных работ, из них 3 статьи. Автореферат полностью отражает основное содержание диссертации.

В заключении стоит подчеркнуть, что сделанные в отзыве незначительные замечания относятся к вопросам оформления диссертации, а не ее сути и не влияют на значимость работы. Учитывая совокупность представленных в работе материалов, совершенно очевидно, что диссертационная работа Д.И.Козловой представляет собой многостороннее, фундаментальное исследование механизмов и факторов регуляции неприлизина и их патогенетической роли, а полученные ею результаты вносят значительный вклад в понимание патогенеза болезни Альцгеймера, открывая новые возможности для ее лечения.

Заключение. Таким образом, диссертацию Козловой Дарьи Игоревны «ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ И РЕГУЛЯЦИИ МЕТАЛЛОПЕПТИДАЗЫ НЕПРИЛИЗИНА В МОЗГЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ» следует признать актуальной, отличающейся высокой степенью новизны полученных сведений, а также значимости сделанных обобщений и выводов. Работа отвечает современным требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям в соответствии с п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденным Постановлением № 842 Правительства РФ от 24 сентября 2013 г., а Козлова Дарья Игоревна заслуживает присвоения ему искомой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.01.04 – биохимия, 03.03.01 – физиология.

Главный научный сотрудник
лаборатории нейроэндокринологии
ФГБУН Института физиологии им. И.П. Павлова РАН,
доктор биологических наук
специальность 03.03.01 – физиология

Е.А.Рыбникова

25 сентября 2015

Федеральное государственное
бюджетное учреждение Институт физиологии
им.И.П.Павлова

Российской академии наук

Адрес: наб. Макарова, д. 6

199034 Санкт-Петербург

Тел. (813) 707-28-50

Факс (812) 328-05-01



Подпись
Удостоверение
Имя, фамилия

Рыбникова Е.А.

Е.А.