

УТВЕРЖДАЮ
Проректор по научной работе
Федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего
образования
«Санкт-Петербургский государственный
университет»
С.П. Туник



23» сентября 2015 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертационную работу
КОЗЛОВОЙ Дарьи Игоревны
«Изучение свойств и регуляции металлопептидазы неприлизина в мозге и плазме
крови млекопитающих»,
представленную на соискание ученой степени
кандидата биологических наук
по специальности 03.01.04 – биохимия
и 03.03.01 – физиология

В настоящее время в связи с увеличением продолжительности жизни одной из наиболее актуальных и значимых с медико-социальной точки зрения проблем является рост нейродегенеративных заболеваний и когнитивных расстройств. В пожилом возрасте увеличивается риск возникновения различных форм нейропатологий, связанных, в большинстве случаев с дегенерацией нейронов центральной нервной системы. Сейчас в литературе накоплен большой материал, свидетельствующий о том, что в патогенезе этих заболеваний, в том числе и болезни Альцгеймера (БА), участвует множество факторов, действие которых проявляется на морфологическом, молекулярном, биохимическом, физиологическом и организменном уровнях. К ним относят нарушения функционирования различных медиаторных систем, функционирования фибриллярных белков и белка- τ (tau), метаболизма амилоидного пептида с образованием токсических сенильных бляшек.

Большой вклад в механизмы развития когнитивных и нейродегенеративных заболеваний вносят также генетические мутации и различные факторы риска, в том числе и пренатальная гипоксия. Однако, несмотря на интенсивные исследования в этой области, пока не обнаружены эффективные средства для профилактики и лечения нейродегенеративных заболеваний. Внимание научного сообщества сосредоточено на поиске способов регуляции метаболизма белка-предшественника бета-амилоида (APP) через стимуляцию активности комплекса альфа-секретазы. Однако, накопленные к

настоящему времени данные, указывают, что при этом нарушается баланс между активностью альфа- и бета-секретазных путей метаболизма APP, что, в свою очередь, сказывается на нормальном протекании физиологических процессов. Способность металлопептидазы неприлизина участвовать в деградации патологических отложений олигомеров бета-амилоидного пептида открывает новые перспективы для лечения болезни Альцгеймера. Однако до сих пор свойства и регуляция этого фермента все еще недостаточно изучены.

В связи с этим тема диссертационной работы Козловой Дарьи Игоревны, которая посвящена изучению содержания, активности и возможных механизмов регуляции экспрессии металлопептидазы неприлизина в тканях млекопитающих в норме и при развитии когнитивных дисфункций, несомненно, **актуальна** и интересна.

Тема данной диссертационной работы, является неотъемлемой частью многолетних исследований, проводимых в Институте эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН.

Диссертация Козловой Д.И. построена по традиционному плану и содержит введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение, заключение, выводы и список использованной литературы. Работа изложена на 140 страницах, включает 1 таблицу и 30 рисунков.

Во введении автор четко и аргументированно сформулировала основные **цели и задачи работы**.

Обзор литературы читается легко, с интересом и включает широкий круг вопросов, связанных с исследованием. В этом разделе диссертант рассмотрела общие представления о роли протеолитических ферментов в организме, уделив особое внимание локализации, свойствам, функциям и физиологической роли цинк-зависимой нейтральной эндопептидазы – неприлизину. Одним из недавно открытых субстратов этого фермента является бета-амилоидный пептид, участвующий в патогенезе болезни Альцгеймера. Приведены имеющиеся на сегодняшний день данные литературы об изменении уровня экспрессии гена и содержания белка неприлизина в онтогенезе, а также обсуждается связь между этими параметрами и развитием болезни Альцгеймера. В связи с этим автор описывает различные пути регуляции экспрессии гена неприлизина, в том числе и фрагментом белка-предшественника амилоидного пептида, а также факторы, влияющие на изменение экспрессии. Одним из таких факторов может быть пренатальная гипоксия.

Отдельные части литературного обзора посвящены структуре и образованию бета-амилоида, описанию когнитивных нарушений и болезни Альцгеймера.

В заключительных разделах обзора литературы Козлова Д.И. остановилась на критическом обсуждении существующих на сегодняшний день подходах к диагностике болезни Альцгеймера и проблемах поиска биомаркеров для ранней диагностики этого заболевания.

Данный раздел диссертации изложен на 32 страницах и включает 6 рисунков.

Методическая часть работы. её солидность, адекватность использованных методов поставленным в диссертации задачам не вызывает сомнения. При выполнении своей диссертационной работы Козлова Д.И. использовала несколько методических подходов: прежде всего это работа с экспериментальными животными – крысы линии Wistar (зоотропная модель), работа на клеточных культурах (культура клеток нейробластомы человека линии NB7) и исследования, проведенные с использованием крови пациентов с когнитивными нарушениями.

С использованием зоотропной модели были проведены следующие эксперименты: определение ферментативной активности и содержания неприлизина в структурах мозга (теменная кора, гиппокамп) и крови крыс в ходе постнатального онтогенеза в норме и после перенесенной пренатальной гипоксии (на 14-й день эмбрионального развития); тестирование когнитивных функций (кратковременная и долговременная память) у тех же экспериментальных животных на определенном этапе постнатального онтогенеза (4 месяца) в контроле, после пренатальной гипоксии и пренатальной гипоксии + введение вальпроата натрия – ингибитора гистондеацетилаз (реализуется в повышении экспрессии и активности неприлизина); влияние введения ингибитора каспазы-3 на экспрессию неприлизина (теменная кора головного мозга крыс) через разные сроки после введения; тестирование когнитивных функций у тех же экспериментальных животных, после введения ингибитора. Важно отметить, что исследование когнитивных функций и биохимических показателей проводили на одних и тех же группах крыс, что позволило автору всесторонне оценить воздействие, как нормального старения, так и патологических условий на организм животного в целом.

На культуре клеток нейробластомы человека линии NB7 были проведены эксперименты по изучению механизмов регуляции экспрессии гена неприлизина в условиях нормоксии и гипоксии. В этих условиях определялась как активность неприлизина, так и его экспрессии на уровне белка и мРНК. Кроме того исследовалась экспрессия (по уровню мРНК) и активность нескольких каспаз, являющихся медиаторами

апоптоза в условиях гипоксии, и уровень связывания транскрипционного фактора AICD (Amyloid Precursor Protein Intracellular Domain, внутриклеточный фрагмент белка-предшественника амилоидного пептида), принимающего участие в регуляции экспрессии неприлизина, с соответствующим промотором.

Помимо экспериментов на животных и культурах клеток автором было проведено сравнительное исследование активности изучаемого фермента в плазме крови пациентов с когнитивными расстройствами (мягкое когнитивное снижение и Болезнь Альцгеймера) и испытуемых из контрольной группы. В этой серии было обследовано 39 человек.

Автором использован комплекс современных физиологических, биохимических и культуральных методов, включающих флуоресцентные, иммуноцитохимические методы, методы работы с белками, молекулярно-биологические методы и пр.

Раздел «Материалы и методы» занимает 14 страниц. В качестве замечаний следует отметить недостаточно четкое описание постановки эксперимента и использованных групп животных, что значительно облегчило бы восприятие большого количества полученных данных. В п.2.7. (Выделение мембрано-связанных фракций белков) нет ссылки на авторов метода и не указано, какую именно мембранную фракцию получали.

Наиболее существенными результатами, определяющими **новизну и научную ценность** диссертационной работы Козловой Д.И., на наш взгляд, являются следующие.

Прежде всего, диссертантом впервые проведен сравнительный анализ активности и содержания фермента в структурах головного мозга крыс в процессе постнатального развития в норме и после перенесенной пренатальной гипоксии (что характеризуется когнитивными дисфункциями в постнатальном онтогенезе). Выбранные сроки постнатального онтогенеза позволили в полной мере охватить различные периоды в развитии головного мозга, начиная от роста клеток, интенсивной миелинизации и до полного созревания мозга и старения организма. Показано, что максимальная активность неприлизина в норме в структурах мозга наблюдается на 10-й день развития, после чего снижается, что обусловлено снижением количества данного белка. Автором показано, что как стареющие животные, так и перенесшие пренатальную гипоксию характеризуются сниженной активностью неприлизина в структурах мозга, что сопровождается снижением когнитивных функций.

Особый интерес представляют разделы диссертации, в которых автор предприняла попытку раскрыть возможные механизмы регуляции гена неприлизина. На клетках нейробластомы человека NB7 получены результаты свидетельствующие, что при гипоксии повышается экспрессия и активность каспаз, и параллельно снижается степень

связывания транскрипционного фактора AICD с промотором гена неприлизина. Четко прослеживается взаимосвязь воздействия ингибитора каспазы-3 и изменение регуляции экспрессии неприлизина за счет увеличения связывания транскрипционного фактора AICD с промотором гена исследованного фермента. Показано, что аналогичный механизм имеет место и у животных. Введение ингибитора каспазы-3 крысам, перенесшим пренатальную гипоксию, приводит к восстановлению содержания AICD и активности неприлизина до уровня, регистрируемого у контрольных крыс. В работе также продемонстрированы альтернативные механизмы регуляции экспрессии неприлизина путем ингибирования гистондеацетилаз вальпроатом натрия или воздействием антиоксиданта зеленого чая – эпигаллокатехин-3-галлата, которые также приводят к восстановлению уровня активности НЕП в мозге до контрольных значений. Важно отметить, что у всех групп животных с введением перечисленных соединений наблюдалось улучшение процессов запоминания и обучения.

Диссертантом впервые установлено, что активность неприлизина имеет разнонаправленные изменения в структурах мозга и плазме крови крыс, как в ходе постнатального онтогенеза, так и после перенесенной пренатальной гипоксии. Были получены данные об активности неприлизина в плазме крови пациентов с диагнозом мягкого когнитивного снижения амнестического типа (а-МКС) и болезнью Альцгеймера. В работе впервые продемонстрировано наличие взаимосвязи между уровнем снижения активности НЕП и степенью выраженности когнитивных нарушений, а также описаны положительные изменения данного показателя при действии лекарственных препаратов, рекомендованных пациентам с а-МКС и БА.

Все полученные результаты изложены на 39 страницах и представлены на 24 рисунках и 1 таблице. Данные обработаны статистически. Достоверность полученных автором данных не вызывает сомнений.

В диссертации имеется глава «**Обсуждение**», в которой автор кратко суммирует полученные результаты и дает им объяснение, сравнивает с имеющимися литературными данными, а также раздел «**Заключение**», в котором подчеркивается приоритетность полученных данных. К сожалению, обсуждение полученного автором обширного экспериментального материала занимает всего 5 страниц.

Список литературы содержит 304 источника, из которых 20 – на русском языке.

Основные **выводы и заключения** диссертации хорошо аргументированы и обоснованы.

Имеется несколько замечаний по оформлению работы. В тексте встречаются опечатки, два разных рисунка имеют один и тот же номер (рис.27), в результате общее количество рисунков в диссертации не 29, а 30. В работе есть неудачные выражения, такие как «уровень содержания», «в условиях действия патологии» и др.

Принципиальных замечаний диссертационная работа Козловой Д.И. не вызывает. В порядке дискуссии хотелось бы получить ответы автора на следующие вопросы:

1. Полученные автором экспериментальные данные свидетельствуют, что максимальная активность неприлизина в норме в обеих исследованных структурах мозга наблюдается на 10-й день постнатального развития и затем снижается. Какое функциональное значение имеет высокий уровень фермента на ранних сроках постнатального развития мозга?

2. Поскольку активность неприлизина в теменной коре и гиппокампе изменяется по-разному, хотелось бы уточнить, из клеток какого отдела мозга происходят клетки линии NB7 нейробластомы человека?

3. В своей работе автор предполагает, что повышение активности неприлизина в крови животных с возрастом является компенсаторным «с целью поддержания гомеостаза уровня нейропептидов, циркулирующих в крови и в спинномозговой жидкости». Какие пептиды (кроме бета-амилоида) являются субстратами неприлизина в плазме крови? Имеются ли литературные данные о том, как меняется их содержание в ходе онтогенеза?

Эти вопросы не носят принципиального характера и не снижают общей высокой оценки диссертационной работы.

Полученные Козловой Д.И. новые экспериментальные данные и сделанные на их основе заключения имеют большое теоретическое значение. Они существенно расширяют наши знания в области механизмов регуляции экспрессии неприлизина в норме и при патологических условиях (гипоксия) и роли данного фермента в развитии нейродегенерации.

Результаты диссертационной работы имеют и определенную практическую ценность, поскольку автором налажен и отработан метод определения активности неприлизина в плазме крови экспериментальных животных и человека, что в будущем может быть использовано в клинике в качестве диагностического критерия для прогнозирования некоторых когнитивных нарушений, в т.ч. и Болезни Альцгеймера.

Результаты диссертационной работы могут быть использованы в научно-исследовательской работе ряда учреждений, в частности: Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, НИИ экспериментальной медицины СЗО РАМН, Институт мозга человека РАН, Институт цитологии РАН, Санкт-Петербургский научно-исследовательский психоневрологический институт им. В.М.Бехтерева и др. Они могут быть использованы в лекционных курсах читаемых в вузах.

Основное содержание диссертации достаточно полно отражено в автореферате и в публикациях автора. По теме диссертации опубликовано 3 статьи в периодических научных изданиях, входящих в профессиональный перечень, утвержденный ВАК Российской Федерации. Результаты исследований, также были представлены на 18 всероссийских и международных конференциях.

Автореферат диссертационной работы Козловой Д.И. отражает полученные результаты и сделанные на их основе выводы и полностью соответствует требованиям ВАК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа **Козловой Дарьи Игоревны «Изучение свойств и регуляции металлопептидазы неприлизина в мозге и плазме крови млекопитающих»**, представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия и 03.03.01 – физиология, является законченной научной квалификационной работой и соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям в «Положении о присуждении ученых степеней», утвержденном Постановлением правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г. (пункт 9-14), а Козлова Дарья Игоревна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия и 03.03.01 – физиология.

Отзыв заслушан, обсужден и одобрен на заседании кафедры биохимии биологического факультета Санкт-Петербургского государственного университета (протокол № 2 от 23 сентября 2015г.)

Отзыв составлен:

Заведующий кафедрой биохимии
Санкт-Петербургского государственного
Университета,
кандидат биологических наук

В.Е. Стефанов

Доцент кафедры биохимии
Санкт-Петербургского государственного
Университета,
кандидат биологических наук

О.В. Галкина

Сведения об организации:

ФГБОУ В О «Санкт-Петербургский государственный университет»
199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9, сайт: www.spbu.ru.

Кафедра биохимии биологического факультета СПбГУ
199004, Средний пр. В.О., д. 41, тел. (812)328-21-82

Подпись *З.С. Стефанов*
ЗАВЕДУЮЩЕЙ
23.09.2015
Стефанов В.Е.

кафедра биохимии биологического факультета СПбГУ