

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу

Рязанцевой Марии Андреевны

на тему «**Нарушение работы депо-управляемых кальциевых каналов при наследственной Болезни Альцгеймера**»,

представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности: 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Актуальность темы диссертации

Актуальность проблемы определяется ее социальной и экономической значимостью. Болезнь Альцгеймера (БА) является наиболее распространенным нейродегенеративным заболеванием у лиц пожилого возраста и проявляется все в большем проценте случаев по мере увеличения продолжительности жизни. Как справедливо отмечает автор, «Исследования в Научно-методическом центре по изучению БА и ассоциированных с ней расстройств НЦПЗ РАМН показали, что на долю БА с поздним началом приходится почти половина случаев деменции в пожилом возрасте. При этом нарушение кальциевого гомеостаза в нейронах рассматривается как одно из ключевых событий при развитии патологии БА и других нейродегенеративных заболеваний (НДЗ)». Основное проявление БА это прогрессивная потеря памяти, то есть нарушение когнитивных способностей. Этиология БА до конца не понятна, предлагаемые средства терапии являются паллиативными, поскольку приводят не к лечению болезни, а только к облегчению ее симптомов. Во многом это происходит потому, что уже к 90-м годам прошлого века преимущественным стало убеждение, что «во всем виноват beta-amyloid protein» и произошло это из-за бурной публикационной активности Dennis Selkoe, например, Selkoe DJ 1994. Cell biology of the amyloid β -protein precursor and the mechanism of Alzheimer's disease. Ann Rev Cell Biol 10: 373–403. К этому времени выделялись миллиардные средства на гранты по исследованию исключительно только роли amyloid β -protein precursor, сторонники иного взгляда на этиопатологию БА переживали резкий крах «научно-метрических показателей». Но понимая важность проблемы для

стареющего человечества и степень все возрастающей экономической нагрузки на семьи больных и клиники, они, из-за безвыходности наукометрии, ухватились за последнюю соломинку – юмор. Так, они назвали превалирующую массу апологетов amyloid β -protein precursor «Баптистами», и стали искать другие триггеры патологии. Особенно жестким было сопротивление в ФРГ, в Вюрцбурге, в 20 км от которого, в Маркбрайте, родился Альцгеймер. Единственный бюст ему установлен рядом с Клиникой Психиатрии и Психотерапии одноименного факультета Университета Вюрцбург. В эти годы там, в Отделении Клинической Нейрохимии (глава – проф. Питер Ридерер) работал и оппонент. Основные посылки исследований этого Institute of Clinical Neurochemistry and National Parkinson Foundation Centre of Excellence Laboratories, Clinic and Policlinic for Psychiatry and Psychotherapy, University of Würzburg, Germany, были: 1) количество бета-амилоидных отложений НИКАК не коррелирует с патологией когнитивных функций, число их может быть велико и у молодых, и у старых здоровых людей, 2) ничто не коррелирует с тяжестью деменции, кроме синаптической патологии, 3) ни одна животная модель не воспроизводит всего набора диагностических признаков хоть БА, хоть любого другого НДЗ. И поэтому надо искать другой путь, что блистательно и сделала Мария Рязанцева в купе («в купе» - это словесный оборот из замечательных текстов диссертанта, столь любезный слуху и стилю оппонента), в купе с зав. Лабораторией Ионных каналов клеточных мембран ФГБУН Института цитологии РАН, Санкт-Петербурга Еленой Валентиновной Казначеевой.

Десятилетия ушли на то, чтобы появилась эта диссертационная работа, прекрасно отраженная в высоко-рейтинговых публикациях. По теме диссертации опубликовано 11 печатных работ, 3 из которых статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК для размещения материалов кандидатских диссертаций, 8 тезисов докладов. Результаты исследования представлены на многих отечественных и зарубежных конференциях и конгрессах. Как оказалось, не только соискатель, но и

оппонент были в 2013 г. на огромном Конгрессе во Флоренции, Италия «Alzheimer's and Parkinson's Disease AD/PD 2013». Оппонент впал в депрессию, увидев эту массу постеров молодых людей с воззрениями на БА датируемые конца 80-х годов, и потому не заметил работы Рязанцевой М.А. При ознакомлении же с текстами диссертационной работы и автореферата выяснилось, что автор – не баптист, что автор четко понимает, что если когнитивные дисфункции – это четкое проявление БА, а успешность формирования памяти определяется синаптической пластичностью, основой которой служит долговременная потенция (LTP) и долговременная депрессия (LTD), напрямую зависящие от регуляции кальциевого гомеостаза в нейронах, то «элементы кальциевой сигнализации в нейронах представляют собой привлекательную мишень для разработки новых фармакологических агентов для лечения». Что определяется функциями депо-управляемых кальциевых каналов, то подробное современное их изучение открывает следующие перспективы: можно будет «разгадать механизмы патологий сразу нескольких НДЗ», как минимум болезней Альцгеймера, Паркинсона и латерального амиотрофического склероза.

Поэтому актуальность исследования несомненна, а само оно имело следующую цель: «разработка клеточных и трансгенных животных моделей болезни Альцгеймера для выявления нарушений в активности кальциевых каналов и регуляторов внутриклеточной концентрации кальция, связанных с патологией, и создания научного задела в области разработки новых фармакологических агентов для терапии данного заболевания». Это потребовало постановки ряда задач:

1. Создание клеточных моделей болезни Альцгеймера с экспрессией мутантных генов, вызывающих наследственную форму этого заболевания (НБА), и выявление нарушений регуляции кальциевого гомеостаза.
2. Поиск молекулярных механизмов лежащих в основе выявленных патологических изменений в регуляции кальциевого гомеостаза, и поиск

возможной молекулярной мишени для потенциального лекарственного препарата и фармакологических агентов на роль лекарственного препарата.

3. Создание трансгенной модели болезни Альцгеймера на основе *Drosophila melanogaster* со вставками мутантных генов человека и выявление ее патологического фенотипа.

4. Тестирование фармакологических агентов, действующих на молекулярные мишени для устранения патологического фенотипа модели болезни Альцгеймера на основе *Drosophila melanogaster*.

Научная новизна. Выявлены изменения в регуляции кальциевого гомеостаза, происходящие под влиянием экспрессии генов, ассоциированных с БА. Впервые описано влияние мутаций в гене пресенилин-1, приводящих к накоплению полноразмерного белка в нейронах, на депо-управляемые кальциевые каналы. Проведен анализ экспрессии основных генов белков, детерминирующих активность депо-управляемых кальциевых каналов (белки семейства TRPC, белок Orai1, белки STIM1 и STIM2, IP3R), который впервые показал, что изменение активности депо-управляемых кальциевых каналов при наследственной БА вызваны функциональными изменениями в их регуляции, а не изменением в уровне экспрессии генов. С использованием специфических shRNA и конфокальной микроскопии на живых клетках впервые выявлена непосредственная роль сенсорных белков эндоплазматического ретикулума STIM в патологических изменениях регуляции концентрации кальция в клетках. Впервые обнаружено патологическое изменение в проведении сигнала от ЭР к кальциевым каналам в плазматической мембране кальциевыми сенсорами STIM. На основании полученных данных сделано предположение о том, что сенсоры STIM могут служить молекулярными мишенями, фармакологическое воздействие на которые могло бы устранять нарушения кальциевого гомеостаза в нейронах при наследственной БА. Впервые проведено тестирование фармакологического агента 2-APB в качестве потенциального лекарственного

препарата для терапии наследственной БА на трансгенной *Drosophila melanogaster*, которое показало его эффективность в восстановлении нарушений кратковременной памяти. Все эти новые и высоко обоснованные результаты получены автором благодаря виртуозному применению огромного арсенала современных подходов и методов нейробиологии. Именно нейробиологии, поскольку это понятие шире, чем дано в определении специализации - клеточная биология, цитология, гистология. Поэтому это диссертационное исследование могло бы стать украшением Диссертационных Советов Институтов Москвы - Молекулярной биологии, Биологии гена, Молекулярной генетики, Биологии развития, и Института цитологии и генетики СО РАН.

Значимость полученных результатов для науки и практического применения. Конкретные рекомендации по их использованию

Теоретическая и практическая значимость. Как справедливо отмечает автор; «Потенциальными потребителями научного результата могут быть профильные компании (как отечественные, так и зарубежные) в области медицинской биотехнологии и доклинической разработки лекарств (эта часть работы может быть осуществлена в России на базе отечественных центров по доклиническим испытаниям лекарственных средств). В качестве продукта исследования можно рассматривать разработанные клеточные и животные модели, которые возможно использовать как для тестирования потенциальных лекарственных препаратов и разработки новых лекарственных препаратов, так и для дальнейших исследований заболевания. Полученные результаты делают возможным предположение о роли производных вещества 2-APB (2-Аминоэтоксидифенилборат) в качестве потенциального лекарственного препарата для устранения нарушений памяти у пациентов с наследственной формой болезни Альцгеймера. Данное предположение может стать отправной точкой для доклинических испытаний на трансгенных мышинных моделях, которые, в свою очередь, могут дать основу для проведения клинических испытаний. Более того, полученный опыт в исследовании болезни

Альцгеймера на клеточных и животных моделях, а также полученные данные могут быть использованы в исследованиях других НДЗ».

Все именно так, но следует отметить, что автором создана технология ускорения скрининга и анализа потенциальных лекарств: экспресс-скрининг и тестирование на дрозофиле с последующим анализом отобранных лекарств-кандидатов на модели трансгенных линий мышей.

Структура и содержание работы

Диссертационная работа является максимально завершенной, Работа изложена на 210 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы по исследуемой теме, материалов и методов исследования, результатов исследования, обсуждения результатов экспериментов, заключения и списка цитируемой литературы, включающего 490 источника (из них 489 иностранных). Работа иллюстрирована 45 рисунками. Оформление текстов и диссертации, и автореферата не вызывает никаких замечаний. Напротив, прочтение диссертации вызывает лишь одну эмоцию – желание сказать спасибо за предоставленное высочайшее эстетическое и интеллектуальное удовольствие.

Соответствие автореферата основным идеям и выводам диссертации

Автореферат полностью отражает содержание диссертации и наглядно свидетельствует об уровне публикаций.

Замечания к работе

Действительно, прочтение Обзора Литературы, который своей необыкновенностью стиля извлекает из памяти только один единственный аналог – лекции на любом языке Евгения Рогаева, с именем которого связано не только клонирование и описание АРОЕ4 и пресенилина, разработка новых методов молекулярной биологии, позволяющим работать с крайне малыми и

древними образцами ДНК, что обеспечило как небывалый прорыв в судебной медицине (популярное изложение сериал «След»), так и в идентификации по пятнышку крови на рубашке Николая II из музейных экспозиций его останков, и построении эволюционных связей между мамонтами, индийскими и африканскими слонами и прочая, однако первое и основное замечание состоит в следующем. Несмотря на то количество упоминаний в тексте роли PSEN1, PS1 DE9, только один раз упоминается Е., но Рogaева. Между тем события к 1995 г. в Университете г. Вюрцбург, Германия, развивались так: 1) мир всколыхнули публикации Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, et al. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature*. 1995;375(6534):754–760 и **Nature**. 1995 376(6543):775-8.

Rogaev EI¹, Sherrington R, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Liang Y, Chi H, Lin C, Holman K, Tsuda T, et al. Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene, Analysis of the 5' sequence, genomic structure, and alternative splicing of the **presenilin-1** gene (PSEN1) associated with early onset Alzheimer disease.

Rogaev EI, Sherrington R, Wu C, Levesque G, Liang Y, Rogaeva EA, Ikeda M, Holman K, Lin C, Lukiw WJ, de Jong PJ, Fraser PE, Rommens JM, St George-Hyslop P. *Genomics*. 1997 Mar 15;40(3):415-24.

2) мы на кафедре генетики и биологии развития Университета Вюрцбурга (зав. Проф. Мартин Хайзенберг) готовили публикации Стефана Шнойли *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Nov 9;96(23):13474-9. INAF, a protein required for transient receptor potential Ca(2+) channel function. Li C¹, Geng C, Leung HT, Hong YS, Strong LL, Schneuwly S, Pak WL и неоднократно цитируемую автором диссертационной работы Kamyshev NG, Pliadi KG, Bragina JV (1999) *Drosophila* conditioned courtship: two ways of testing memory. *Learn Mem* 6:1–20

и

3) работали над отладкой этой новой методики.

Поэтому вопросы:

- 1) Почему в должной мере не отражена роль Евгения Рогаева, который, кстати, и первым обозначил в публикациях и вклад микро РНК - Rogaev EI (2005) Small RNAs in human brain development and disorders. Biochemistry 70:1404–1407?
 - 2) Что имеется в виду на Рисунке 44. Предотвращение потери кратковременной памяти у дрозофил с экспрессией PS1 ΔE9 в холинэргической нервной системе с помощью 2-APB, если на оси ординат обозначение ИУ, что означает Индекс Ухаживания, а приводимы данные явно ИО – Индекс Обучения?
 - 3) Почему говорится «В течение 7 дней в еду для мух добавляли...», т.е. почему 7 дней, если опыты в норме, а не при старении, проводят в возрасте 5 дней?
- Замечания.
- 1) Часто в рецензируемых статьях и диссертациях авторы путают возвратную (применялось, определялось, раскапывалось, растворялось – то есть они так сами с собой поступали) и безличную форму глагола, что только и допустимо для описания методик (раскапывали, помещали и т.д. С ними это делал коллектив авторов). В данном случае, учитывая общий уровень диссертационной работы, когда приходилось неоднократно смотреть – на соискание какой степени она представлена – действительно кандидата или все же доктора наук, это замечание было бы излишне. Однако при прочтении фразы «Через 1 час тренировки самцы сразу же перемещались в чистую камеру с другой нерцептивной самкой» у работающего с поведением дрозофилы происходит ошибка, поскольку многие методики основаны на том, что мухи перемещаются в силу врожденного позитивного фототаксиса или отрицательного геотаксиса. Они перемещаются потому, что стремятся к источнику света, либо ввысь. Поэтому именно этот пример призывает соблюдать правило возвратной и безличной форм глагола. Не мухи перемещались, а мух помещали.
 - 2) Фраза «Однако недавно спарившиеся самки невосприимчивы и имеют перекрывающийся, но измененный феромонный профиль, который самцы находят менее привлекательным, чем у девственных самок» Не отражает

существа. Дело в том, что в методике используется следующее свойство: и виргинные, и оплодотворенные самки пахнут одинаково привлекательно (кстати, как и юны самцы), источая феромон афродизиак. Однако при оплодотворении самец вместе со спермой впрыскивает фермент, которого у нее нет. Фермент расщепляет субстрат, которого нет у самца с образованием золотильного антиафродизиака, по сути – репеллента. Начав ухаживание, самец не знает, какая именно самка перед ним, но дойдя до стадии попытки копуляции, он вступает в процесс обучения по типу выученной беспомощности: копуляция невозможна физически, поскольку оплодотворенная самка вытягивает наружу яйцевод сопровождает это тем, что именно из яйцевода происходит эмиссия этого отвратительно пахнущего феромона. Набрав за 30 мин обучения свою индивидуальную частоту отказов, самец впоследствии перестает ухаживать. Он ограничивается ознакомительной стадией – ориентации и максимум доходит до попытки копуляции.

Однако, ни один из вопросов и ни одно из замечаний не сказываются на оценке работы.

Заключение

Диссертационная работа **Рязанцевой Марии Андреевны** полностью соответствует требованиям пункта 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденным постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям: 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Официальный оппонент

Доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник,

заведующий лабораторией нейрогенетики

Федерального государственного учреждения

науки «Институт физиологии им. И.П. Павлова»

Российской академии наук

Савватеева-Попова Елена Владимировна



[Handwritten signature]
Савватеевой-Поповой Е.В.
04.12.2012 *[Handwritten initials]*

Подпись Е.В. Савватеевой-Поповой заверяю

Ученый секретарь Федерального государственного учреждения

науки «Институт физиологии им. И.П. Павлова»

Российской академии наук А.Е. Чуйкин

[Handwritten signature]

Адрес: 199034, г. Санкт-Петербург, наб. Макарова д.6. Федеральное государственное учреждение науки «Институт физиологии им. И.П. Павлова»
Российской академии наук;

тел.: +7 (812) 328 13 01

e-mail: esavvateeva@mail.ru