

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию

Ильи Михайловича Голомидова

«Изучение ранних нейродегенеративных процессов при наследственной форме болезни Паркинсона и поиск потенциальных агентов для терапии заболевания на модели *Drosophila melanogaster*»,
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7 Генетика

Диссертационное исследование И.М. Голомидова посвящено исследованию ранних нейродегенеративных процессов при наследственной форме болезни Паркинсона и поиску потенциальных агентов для разработки терапии заболевания с привлечением моделей на *Drosophila melanogaster*.

Актуальность работы. Для современной биологии крайне необходимо понимание молекулярных и клеточных механизмов нейродегенерации, влекущей и сопровождающей многие социально значимые заболевания нервной системы, что, несомненно, можно отнести к числу важнейших насущных проблем физиологии и медицины. Весьма значимым в этом аспекте является изучение роли гена альфа-синуклеина (*SNCA*) в развитии нейродегенерации. Несмотря на ведущиеся в этой области активные исследования, показавшие, что именно склонность α -синуклеина к формированию агрегатов различной структуры является ключевым патоморфологическим фактором болезни Паркинсона (БП), до сих пор нет однозначного представления, какие факторы приводят к этим дефектам и какие формы α -синуклеина оказывают большее влияние на нарушение синаптических функций. По-прежнему окончательно не определен спектр функций α -синуклеина. Именно в русле поиска решения этих проблем и находится работа И.М. Голомидова. Весьма оригинальным является рассмотрение именно ранних нейродегенеративных процессов, протекающих при гиперэкспрессии гена *SNCA*. Клинические проявления нейродегенеративных заболеваний, как правило, наблюдаются в пожилом

возрасте, однако патологический процесс начинает развиваться намного раньше. Для обеспечения возможности диагностировать заболевание на ранней стадии разрабатываются стратегии обнаружения различных биомаркеров БП. Ранняя диагностика БП важна не только в плане своевременного назначения лечения и улучшения качества жизни пациентов, но и для реализации стратегий нейропротективной и превентивной терапии. Детальному исследованию этой актуальной проблемы и посвящена диссертационная работа И.М. Голомидова.

Поскольку на сегодняшний день не существует эффективной терапии болезни Паркинсона, способной полностью остановить прогрессию заболевания, анализ нейропротекторной активности ряда соединений, способных повлиять на развитие нейродегенеративных процессов, предпринятый в рамках диссертационного исследования И.М. Голомидова, представляет сугубый интерес как для фундаментальной науки, так и для прикладных медико-биологических исследований.

Изучение патогенеза БП и поиск перспективных агентов, способных оказать нейропротекторное действие, требует поиска адекватных животных моделей. С этой точки зрения вполне правомерным является предложенное в данной работе использование в качестве такой модели дрозофилы, являющейся хорошо изученным нейрогенетическим объектом, обладающим сложной дофаминергической нейронной системой, содержащей кластеры дофаминергических нейронов. Возможность создавать трансгенные линии *D. melanogaster* с экспрессией генов человека позволяет использовать их для изучения влияния конкретного гена на патогенез заболевания.

Именно с использованием дрозофилы в качестве модельного объекта автором показано, что гиперэкспрессия гена *SNCA* человека дикого типа и его форм с мутациями в моторных нейронах личинок *D. melanogaster* приводит к нарушению формирования синаптических контактов, а также влияет на локализацию синаптотагмина. Выявлено замедление развития

нейропатологии у дрозофилы при подавлении экспрессии гена *SNCA* человека дикого типа и его форм с мутациями, а также применении «красного пигмента» дрожжей *S. cerevisiae*, фуллеренолов $C_{60}(OH)_{30}$ и $C_{70}(OH)_{30}$ и фармакологических шаперонов глюкоцереброзады.

Таким образом, исследование нейропатологии, вызванной гиперэкспрессией и наличием мутаций в гене *SNCA*, выполненное с привлечением трансгенных линий *Drosophila melanogaster* с управляемой экспрессией гена *SNCA*, является **актуальным и перспективным направлением** и позволит приблизиться к более глубокому пониманию механизмов развития нейродегенеративных патологий.

Структура диссертации. Материал изложен ясно, диссертация структурирована и хорошо оформлена. Работа изложена на 174 страницах машинописного текста и имеет традиционную структуру: состоит из списка сокращений, введения, аналитического обзора источников, изложения материалов и методов исследования, собственных результатов исследования и их обсуждения, выводов, списка цитируемой литературы. Работа иллюстрирована 33 рисунками и 4 таблицами. Соотношение разделов в диссертации является сбалансированным по объему. Список литературы включает 311 источников, из них 1 русскоязычный и 310 англоязычных.

Во введении обоснована актуальность и степень разработанности темы исследования, четко и корректно сформулированы цель и задачи исследования, научная новизна, теоретическая и практическая значимость, основные положения, выносимые на защиту, отражены степень достоверности и апробация результатов, а также связь работы с проектами, публикации по теме диссертации, структура и объем диссертации.

В «Аналитическом обзоре источников по теме работы» приводится развернутый хронологический обзор развития диагностики болезни Паркинсона, описаны основные компоненты ее клинической картины. Подробно разбирается структура, функции и роль α -синуклеина в

патогенезе БП. Отдельного упоминания заслуживает раздел, посвященный участию в патогенезе БП альтернативных генов, что имеет первостепенное значение для понимания молекулярных механизмов, лежащих в основе развития заболевания. Большое внимание уделено возможностям использования модельных объектов, прежде всего *Drosophila melanogaster* для анализа нейродегенеративных процессов на протяжении всей жизни, включая предсимптоматическую фазу прогрессирования заболевания, которая важна для понимания ранних процессов нейродегенерации. Примечателен обстоятельный раздел, повествующий о подходах к терапии БП, включая новые стратегии лечения. Заключают обзор выводы по разделу, что органично подводит читателя к экспериментальной части работы. При чтении «Аналитического обзора источников» становится очевидным, что автор обладает глубокими и обширными знаниями круга проблем и литературы по избранной тематике.

В главе «Материалы и методы исследования» изложена общая характеристика использованных в работе линий дрозофилы. Большое количество экспериментальных скрещиваний повлекло за собой утяжеление этой главы однотипными схемами, для которых, возможно, стоило найти графическое решение. Далее подробно описаны методы исследования, в частности, молекулярно-биологические, иммуногистохимические и микроскопические методы, анализ локомоторного поведения и продолжительности жизни дрозофилы. Приведено описание используемых фуллеренолов и фармакологических шаперонов глюкоцереброзидазы. Статистическая обработка адекватна используемым экспериментальным методам. Автором использован широкий арсенал современных методик, позволяющих сделать обоснованное заключение по исследуемой проблеме.

В главе «Результаты исследований и их обсуждение» приведены результаты собственных исследований и анализ полученных данных.

Экспериментальный материал изложен детально и хорошо проиллюстрирован рисунками.

В начале экспериментальной части работы Илья Михайлович проводит морфологический и функциональный анализ нервно-мышечных соединений у личинок *D. melanogaster* для исследования синаптической функции α -синуклеина. Выявлено, что экспрессия гена *SNCA* человека, как дикого типа, так и его форм с мутациями у дрозофилы приводит к уменьшению количества сателлитных бутонов, но не больших бутонов типа 1b.

Далее диссертант анализирует распределение белка синаптотагмина-1 в нервно-мышечных соединениях личинок дрозофилы. Обнаружено изменение его локализации при гиперэкспрессии гена *SNCA* человека дикого типа и его форм с мутациями. Данные результаты дают возможность предполагать, что нарушение распределения синаптотагмина-1 может приводить к дестабилизации белковых комплексов с синаптическими везикулами, а также развитию синаптической дисфункции.

Суммируя полученные в этой части работы результаты, автор заключает, что развитие синаптической дисфункции под влиянием экспрессии *SNCA.WT/SNCA.A30P/SNCA.A53T* является комплексным процессом – уменьшается количество сателлитных синаптических бутонов и площадь синаптических контактов, нарушается распределение пресинаптического белка синаптотагмина-1, снижается количество митохондрий в нервно-мышечном соединении. Полученные данные позволяют говорить о начале развития синаптической патологии уже на самой ранней стадии развития.

Интересен раздел, посвященный влиянию подавления экспрессии гена *SNCA* человека и его форм с мутациями на развитие ранней нейропатологии при БП на модели *D. melanogaster*.

Анализ литературных данных о токсичности различных конформационных состояний α -синуклеина ставит перед Ильей Михайловичем закономерный вопрос о зависимости степени развития нейродегенерации от уровня различных форм α -синуклеина. И полученные с привлечением трансгенных линий *Drosophila melanogaster* с управляемой экспрессией гена *SNCA* результаты позволяют говорить о том, что растворимая форма α -синуклеина, в отличие от нерастворимых агрегатов, вносит большой вклад в патогенез БП на ранних стадиях развития нейропатологии.

Полученные диссертантом данные являются оригинальными и позволяют выдвинуть предположение, что гиперэкспрессия гена *SNCA* человека и его форм с мутациями у дрозофилы способствует изменению уровня экспрессии других синаптических генов, играющих ключевую роль в процессах синаптической передачи. Выявленная автором зависимость распределения синаптотагмина-1 при экспрессии гена *SNCA* человека дикого типа и его форм с мутациями сподвигла предпринять лежащее в этой же логической парадигме исследование, как гиперэкспрессия данного гена влияет на уровень экспрессии синаптических генов *Syt1* и *nSyb* в клетках мозга трансгенных *D. melanogaster*, обнаружившее изменение уровня их экспрессии.

Далее автор, принимая во внимание, что в настоящее время не разработано эффективных терапевтических подходов к лечению заболеваний, связанных с амилоидами, обращается к поиску новых агентов, способных оказать нейропротекторное действие. Илья Михайлович предпринимает исследование нейропротекторной активности «красного пигмента» дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Оказалось, что использование в качестве корма красных дрожжей позволило значительно замедлить развитие нейропатологии, что выражалось в сохранении большего числа дофаминергических нейронов, а также уровня локомоторной активности на более высоком уровне.

Понимание необходимости комплексности терапии БП не позволяет автору остановиться на достигнутом, и он приступает к изучению нейропротекторной активности фуллеренолов. Сопоставление литературных данных о важной роли окислительного стресса и нарушения конформации белков в развитии нейродегенерации с известными антиоксидантными и антиагрегационными свойствами фуллеренолов побуждает его допустить и наличие у них способности к защите, восстановлению или регенерации нервной системы. Упорство исследователя вознаграждено - оба исследованных фуллеренола проявляли сходную нейропротекторную активность в экспериментах на дрозофиле.

Эти интригующие результаты побуждают Илью Михайловича к расширению спектра исследуемых перспективных нейропротекторных соединений. С этой целью им предпринят анализ защитных свойств фармакологических шаперонов глюкоцереброзадазы. Полученные данные (сохранение большего количества дофаминергических нейронов и повышенной двигательной активности) свидетельствуют об эффективности использования новых фармакологических шаперонов глюкоцереброзадазы на модели болезни Гоше на *D. melanogaster*. Исходя из этого, автор предполагает, что новый класс соединений может быть перспективен как для терапии болезни Гоше, так и для снижения риска возникновения БП, путем поддержания активности глюкоцереброзадазы.

Следует подчеркнуть четкую постановку задач экспериментов, вытекающих из полученных в предыдущих частях работы результатов, что свидетельствует о комплексном походе автора к изучаемой проблеме. Отдельно нужно отметить подведение итогов разделов работы в форме заключений, акцентирующих внимание на основных результатах и выстраивающих общую концепцию проведенных исследований. Полученные автором собственные результаты обсуждаются с привлечением современных литературных данных, что позволяет

существенно расширить представления о роли экспрессии гена α -синуклеина в развитии нейродегенеративных процессов.

Все результаты, представленные на защиту, получены либо лично диссертантом, либо при его непосредственном участии, что подтверждается опубликованными 4 статьями в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК, и апробацией результатов на международных и российских конференциях. **Выводы** работы полностью обоснованы полученными результатами исследования.

Представленное И.М. Голомидовым диссертационное исследование, несомненно, обладает **научной новизной**, демонстрируя, что подавление экспрессии гена *SNCA* человека дикого типа и его форм с мутациями замедляет развитие нейропатологии, а наличие растворимых форм α -синуклеина связано с прогрессированием нейродегенерации. В работе впервые показано, что гиперэкспрессия гена *SNCA* человека дикого типа и его форм с мутациями влияет на формирование синаптических контактов дрозофилы, а также на распределение синаптических белков в синаптическом бутоне. Получены новые оригинальные данные о нейропротекторной активности «красного пигмента» дрожжей *S. cerevisiae* и нейропротекторных свойствах фуллеренолов $C_{60}(OH)_{30}$ и $C_{70}(OH)_{30}$. Выявлено, что применение фармакологических шаперонов глюкоцереброзидазы, относящихся к классу аллостерических активаторов, может влиять на скорость развития нейродегенерации на модели болезни Гоше на *D. melanogaster*.

Теоретическая и практическая значимость работы определяется полученными сведениями о роли α -синуклеина в формировании и поддержании синаптических контактов, а также его влиянии на распределение синаптического белка синаптотагмина. Установлена связь между развитием ранней нейропатологии и продолжительностью экспрессии гена *SNCA* человека дикого типа и его форм с мутациями, что является безусловно значимым для понимания механизмов развития

нейродегенеративных заболеваний. Практическая значимость работы обусловлена исследованием «красного пигмента» дрожжей *S. cerevisiae* и фуллеренолов $C_{60}(OH)_{30}$ и $C_{70}(OH)_{30}$ в качестве соединений, обладающих возможным нейропротекторным эффектом. В работе показана эффективность данных веществ в отношении замедления развития нейродегенерации. Также исследован новый класс низкомолекулярных шаперонов глюкоцереброзидазы, направленных на терапию болезни Гоше, но опосредованно способных влиять на снижение риска развития БП. Настоящее исследование может послужить теоретической базой для разработки эффективных методов диагностики и лечения заболеваний нервной системы.

Достоверность и обоснованность научных положений и выводов, сформулированных в диссертации. Экспериментальные данные, лежащие в основе диссертационного исследования И.М. Голомидова, получены на большом объеме животных, с использованием современных методов, адекватных поставленным задачам, достоверность представленных в диссертации материалов не вызывает сомнений.

Автореферат полностью отражает основное содержание диссертации.

Принципиальных замечаний по сути работы нет, однако она не свободна от редакционных погрешностей. В работе встречаются неточности оформления (шкалы на некоторых рисунках имеют разную размерность; в списке сокращений вначале приведены англоязычные, а затем русскоязычные аббревиатуры; нет единообразия в упоминании зарубежных авторов – фамилии приведены то на латинице, то на кириллице; дважды встречается пункт 2.2: 2.2. Получение линий мух с гиперэкспрессией гена *SNCA* человека дикого типа и его форм с мутациями – с. 60 и 2.2. Приготовление препаратов личинки *D. melanogaster* для лазерной конфокальной микроскопии – с. 68), орфографические, а также множественные пунктуационные и грамматические ошибки, досадные опечатки, стилистически неудачные и

жаргонные выражения (например, гомозиготные и гетерозиготные мутации (с. 6, 32)).

После прочтения текста диссертации остаются следующие **вопросы**:

1. Является ли действие альтернативных генов, участвующих в патогенезе болезни Паркинсона, изолированным или же они вовлечены в образование сетей?
2. Все ли описанные препараты для лечения болезни Паркинсона зарегистрированы в России?
3. Различаются ли пути и конечные продукты обмена красного пигмента дрожжей, фуллеренолов и шаперонов глюкоцереброзидазы у насекомых и млекопитающих?

Данные вопросы носят дискуссионный характер и не отражаются на общей высокой положительной оценке диссертационной работы.

Заключение.

Учитывая совокупность представленных в работе материалов, совершенно очевидно, что диссертационная работа И.М. Голомидова представляет собой многостороннее исследование роли гена α -синуклеина в развитии ранней нейропатологии, что вносит значительный вклад в раскрытие механизмов нейродегенерации.

Диссертация Ильи Михайловича Голомидова на тему «Изучение ранних нейродегенеративных процессов при наследственной форме болезни Паркинсона и поиск потенциальных агентов для терапии заболевания на модели *Drosophila melanogaster*» является законченной научно-квалификационной работой, в которой сформулированы и обоснованы научные положения, совокупность которых можно классифицировать как новое решение задачи по совершенствованию представлений о роли α -синуклеина в патогенезе нейродегенеративных патологий, что имеет существенное значение для генетики. Диссертация И.М. Голомидова соответствует специальности 1.5.7 Генетика и отрасли наук 1.5. Биологические науки, по которым она представлена к защите.

Таким образом, диссертационная работа Голомидова Ильи Михайловича, представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7 Генетика, по содержанию, актуальности, достоверности и научной новизне, объему проведенных исследований и степени обоснованности научных положений соответствует критериям п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор, Голомидов Илья Михайлович, заслуживает искомой степени.

Профессор кафедры анатомии и физиологии человека и животных
Федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего образования
«Российский государственный педагогический
университет им. А. И. Герцена»
доктор биологических наук (03.03.01 - физиология,
03.02.07 – генетика), доцент



Никитина Екатерина Александровна

191186, Санкт-Петербург, наб. р. Мойки, д. 48
Тел.: 8(812) 643-77-67
<https://www.herzen.spb.ru/>
e-mail: nikitinaea@herzen.spb.ru
02.02.2023.



РГПУ им. А.И. ГЕРЦЕНА

подпись



Ведущий документовед
И.И. дела кадров

удостоверяю «2» 02 2023 г.

Отдел кадров управления по работе с кадрами
и организационно-контрольному обеспечению

В.В. Рубинчик