

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ФГБНУ «Институт
экспериментальной медицины»

д.б.н. проф. РАН

_____ А.В. Дмитриев

_____ 2023 г.



Отзыв ведущей организации

о научно-практической значимости диссертационной работы Голомидова Ильи Михайловича на тему «Изучение ранних нейродегенеративных процессов при наследственной форме болезни Паркинсона и поиск потенциальных агентов для терапии заболевания на модели *Drosophila melanogaster*», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7. «Генетика»

Актуальность темы выполненной диссертации

Болезнь Паркинсона является одним из самых распространенных нейродегенеративных заболеваний человека, часто поражающим лиц среднего трудоспособного возраста. Повышение средней продолжительности жизни в развитых странах способствует увеличению числа случаев заболевания. Болезнь Паркинсона по современной классификации относится к амилоидозоподобным заболеваниям, которые отличаются от истинных амилоидозов внутриклеточной локализацией фибриллогенного материала. В настоящее время доказано, что в состав внутриклеточного амилоида при болезни Паркинсона входит белок альфа-синуклеин в амилоидогенной конформации. Предполагается, что альфа-синуклеиновые агрегаты являются молекулярным субстратом патогенеза болезни. Однако существуют серьезные аргументы против такого прямого объяснения нейродегенерации, хотя эти аргументы и не противоречат значимости синуклеина в развитии патологии. Как и при многих других нейродегенеративных заболеваниях наряду с более частыми условно спорадическими случаями для болезни Паркинсона известны наследственные формы с доминантным типом проявления. Существование таких генетически обусловленных случаев открывает возможности более подробного изучения патологии в частности на животных

моделях, так как при наследственных формах заболеваний уменьшается роль негенетических факторов, которые усложняют изучение деталей патогенеза. Одним из наиболее мало изученных проявлений болезни Паркинсона являются ранние часто доклинические стадии, диагностика которых при правильной терапии может существенно отсрочить манифестацию выраженных симптомов болезни.

Таким образом несмотря на значительное число работ посвященных изучению основ патогенеза болезни Паркинсона до сих пор остается большое число вопросов, решение которых позволило бы разработать подходы для ранней диагностики и эффективной терапии этого тяжелого, в настоящее время неизлечимого страдания. Поэтому создание и адекватное изучение разнообразных моделей болезни представляется весьма актуальным и своевременным. И.М. Голомидов как раз и посвятил свое исследование созданию моделей болезни Паркинсона на дрозофиле и изучению ранних моментов патогенеза путем использования разнообразных генетических, биохимических, морфологических и физиологических методов. Кроме того он использовал модели для изучения возможности терапии болезни Паркинсона на ранних стадиях заболевания. Актуальность такого подхода не вызывает сомнений.

Новизна исследования

Получены удобные для исследования трансгенные линии дрозофилы с экспрессионными вариантами генов синуклеина и глюкоцереброзидазы. На моделях болезни Паркинсона у дрозофилы впервые показано, что экспрессия нормального и мутантных вариантов гена *SNCA* человека оказывает влияние на образование синаптических контактов в нервной системе дрозофилы и на взаиморасположение синаптических белков в синаптических бутонах. Выявлено, что температурное подавление экспрессии нормального и мутантных вариантов гена *SNCA* человека у трансгенных мух замедляет морфологические ранние проявления нейродегенерации. Прогрессирование нейродегенеративных процессов прямо зависит от концентрации неагрегированных форм синуклена. Впервые обнаружено, что так называемый «красный пигмент» (производное рибозиламиноимидазола) дрожжей при скармливании мухам оказывает нейропротекторный эффект на фоне экспрессии вариантов генов синуклеина. Нейропротекторным действием обладают также гидроксильированные производные фуллеренов. На моделях мух с болезнью Гоше выявлено угнетение развития нейродегенерации под влиянием синтетических аллостерических активаторов глюкоцереброзидазы человека.

Научно-практическая значимость работы

Выяснение закономерностей ранних изменений в нервных клетках, свойственных болезни Паркинсона, может служить основанием для понимания молекулярных основ патогенеза этого тяжелого заболевания. Автор выявил отличительные особенности морфологических, биохимических и физиологических изменений в нервной системе дрозофил, трансфицированных геном *SNCA* человека и вариантами гена, которые вызывают наследственную форму болезни Паркинсона. Показана важная роль синтезируемого синуклеина в формировании синаптических контактов и распределения синаптического белка дрозофилы – синаптотагнина. Установлено, что ранние проявления нейродегенерации зависят от продолжительности экспрессии вариантов гена *SNCA*. Выяснено, что экспрессия вариантов гена *SNCA* влияет на уровень экспрессии некоторых собственных генов дрозофилы, ответственных за функционирование синапсов.

С практической точки зрения в работе испытано действие «красного пигмента» дрожжей и гидроксिलированных производных фуллеренов на трнсенных мух с вариантами гена *SNCA*. Нейропротекторный эффект этих соединений открывает возможности для испытаний их терапевтической значимости. В разделе, посвященном влиянию активаторов глюкоцереброзидазы, продукта гена, мутации которого в гомозиготном состоянии обуславливают развитие болезни Гоше, на процессы нейродегенерации показана перспективность этих соединений для терапии болезни Паркинсона, риск развития которой повышается у гетерозиготных носителей мутаций болезни Гоше.

Достоверность результатов

Достоверность полученных автором результатов подтверждается использованием адекватных методических приемов, а также применения современных статистических способов оценки их значимости. Представленные результаты, полученные разными методическими подходами, согласуются между собой и не противоречат данным, известным из литературных источников.

Схема диссертации

Диссертация изложена на 174 страницах, содержит 33 рисунков и 4 таблицы а также 311 литературных источников. Состоит из списка сокращений, введения, аналитического обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, выводов и списка литературы. Результаты опубликованы в 5 статьях, 4 из которых входят в список рекомендованных ВАК, и в 15 тезисах. Отличительной особенностью данной работы является обсуждение полученных результатов в соответствующих разделах без их заключительного суммирования, которое имеет место в автореферате. Очевидно, что краткое заключение в автореферате вызвано ограничениями рекомендованного объема автореферата, которое не позволило включить в текст заключения по каждому из разделов главы «результаты и обсуждение». В целом результаты и выводы представленные в основном тексте диссертации соответствуют таковым в автореферате.

Литературный аналитический обзор

В обзоре литературы приведены современные представления о механизмах патогенеза болезни Паркинсона. Особое внимание уделено генетически детерминированным формам заболевания. Представлена история развития представлений о болезни Паркинсона. Показана роль альфа-синуклеина в патогенезе и приведены наиболее частые мутации гена синуклеина, приводящие к развитию аутосомно-доминантной формы болезни Паркинсона. Детально охарактеризованы структура и физико-химические, а также физиологические свойства синуклеина. Обсуждены условия фибриллогенеза данного белка. Показано участие синуклеина в патогенезе болезни Паркинсона. Обсуждаются вопросы токсического действия олигомеров и фибриллярных агрегатов синуклеина. Представлены результаты изучения других генетических факторов риска развития болезни Паркинсона, в частности мутантных вариантов гена глюкоцереброзидазы, обуславливающих в гомозиготном или компаундном состоянии развитие разных форм болезни Гоше, которые повышают риск развития болезни Паркинсона у гетерозиготных носителей. Обсуждаются вопросы ранней диагностики болезни Паркинсона, основные принципы терапии на разных стадиях развития заболевания, а также вопросы моделирования болезни на разных биологических объектах. На основании анализа литературных данных обосновывается актуальность исследования молекулярных основ патогенеза болезни Паркинсона, в частности роли мутаций в гене синуклеина и глюкоцереброзидазы, на модельных объектах. Особое внимание уделяется моделированию на дрозофиле и приводятся доводы в пользу перспективности таких моделей для изучения патогенеза болезни Паркинсона и выявления

потенциальных терапевтических реагентов. В итоге обосновывается заключение о необходимости представленного исследования.

Материалы и методы

Методический арсенал обширен и адекватен поставленным цели и задачам исследования. Получены и охарактеризованы трансгенные линии мух, продуцирующие варианты синуклеина и глюкоцереброзидазы. Приведены детальные описания генетических, биохимических, морфологических и функциональных методов, использованных в работе. Указан аппарат оценки статистической значимости полученных результатов.

Результаты и обсуждение

Глава результаты и их обсуждение занимает наибольший объем в диссертационной работе и состоит из 5 разделов. Результаты каждого раздела обсуждаются отдельно, что в какой-то степени снимает необходимость обобщающего заключения.

Первый раздел посвящен изучению влияния экспрессии вариантов гена *SNCA* человека на ранние стадии развития синаптической патологии у личинок дрозофилы. Показано уменьшение числа сателитных синаптических бутонов и площади синаптических контактов, а также нарушение распределения синаптоагмина-1. Выявлено уменьшение числа митохондрий в нервно-мышечных соединениях. Предполагается, что продукция синуклеина человека нарушает формирование и поддержание синаптических контактов и указывает на раннее развитие патологии синапсов.

Во втором наиболее объемном разделе представлены результаты изучения влияния подавления экспрессии вариантов гена *SNCA* человека на морфологические и биохимические показатели в мозге дрозофилы. Высказана идея о значимости растворимой и агрегированной форм синуклеина в раннем развитии синаптической патологии. Отмечена более значимая роль растворимой фракции синуклеина в патогенезе ранних проявлений заболевания.

Третий раздел включает анализ влияния «красного пигмента» дрожжей на развитие патологических проявлений болезни Паркинсона. Выявлено, что кормление мух с синуклеиновой моделью болезни Паркинсона дрожжами с «красным пигментом» способствует более высокому уровню сохранения дофаминергических нейронов по сравнению с мухами, получавшими в пищу

дрожжи без пигмента. Кроме того «красный пигмент» уменьшает нарушения локомоторной активности мух.

В четвертом разделе изучалась нейропротекторная активность производных фуллеренов – высоко гидроксильированных фуллеренолов. Показано, что фуллеренолы с 60- и 70-ю атомами углерода обладают сходным нейропротекторным эффектом. Фуллеренолы снижают уровень окислительного стресса, уменьшают содержание нерастворимых форм синуклеина и способствуют сохранению дофаминергических нейронов. Отмечено различное влияние фуллеренолов в зависимости от экспрессии разных вариантов гена *SNCA*.

Последний раздел посвящен анализу гена глюкоцереброзидазы, мутации которого обуславливают в гомозиготном состоянии развитие болезни Гоше, а в гетерозиготном состоянии увеличивают риск развития болезни Паркинсона, предположительно, за счет подавления деградации синуклеина в результате накопления цереброзида. Автор изучал влияние аллостерических активаторов глюкоцереброзидазы на функциональные показатели нервной системы дрозофил с моделью болезни Гоше. Отмечается, что синтетические аллостерические активаторы фермента обладают нейропротекторным свойством при скармливании трансгенным мухам с моделью болезни Гоше.

Замечания и вопросы

Необходимо отметить незначительные стилистические погрешности. Например, встречающееся несколько раз предложение: «Также хочется отметить, что до сих пор, ни одно лекарственное средство не останавливает, а только лишь замедляет, прогрессию заболевания.» В данном предложении усиливающая отрицание частица «ни» действует в пределах отрицательной части предложения, но не согласуется с утвердительной частью. В другом предложении: «Следует отметить, что две каталитические аминокислоты, определяющие активность глюкоцереброзидазы, идентичны между человеком и дрозофилой». Речь идет о том, что каталитические активные центры глюкоцереброзидаз человека и дрозофилы содержат одни и те же аминокислотные остатки.

Не понятно, что автор подразумевает по термином «гиперэкспрессия», так как никаких количественных оценок уровня экспрессии генов ни на уровне белка, ни на уровне РНК не приводится. В то же время результаты электрофоретического анализа не указывают на высокий уровень синтеза синуклеина по сравнению с референсным белком – тубулином. Кроме того

автор применяет как термин «гиперэкспрессия», так и «экспрессия» в сходных ситуациях.

Автор в списке сокращений приводит аббревиатуры гена и его мутантных вариантов, а в тексте часто использует полные их названия. Следовало бы во всех случаях использовать сокращения. Кроме того выражение «ген человека дикого типа» не очень удачно. Действительно, в генетике «дикий тип» устоявшееся словосочетание, однако применительно к человеку лучше говорить о немутантном, нормальном, самом частом варианте. Тем более что речь идет о гене дикого типа, а не о человеке дикого типа.

В настоящее время термин «молекулярный вес» рекомендуется заменять на «молекулярная масса»

Термин «фибрилляция» в медицинской практике означает форму аритмии сердечной деятельности. Во избежание неправильного толкования процесс формирования белковых фибрилл лучше называть «фибриллогенез».

На некоторых рисунках, к сожалению, не указано, какие компоненты, как окрашены. Так как представлены результаты конфокальной микроскопии, то оценивается только интенсивность флуоресценции, а цвет может быть любой. Поэтому важно указывать, каким компонентам соответствуют какие цвета.

Дискуссионным является вопрос о механизмах противофибриллогенного действия фуллеренолов. Автор предполагает, что основную роль играют гидрофобные взаимодействия. Однако большое число гидроксильных групп скорее говорит об участии водородных связей, то есть об образовании таковых между фуллеренолами и полипептидным скелетом фибриллогенных белков. Блокада межмолекулярных водородных связей в бета-структурированных белках фуллеренолами способствует диссоциации полипептидов.

Указанные замечания и вопросы не являются критичными и не влияют на общее положительное впечатление от работы.

Заключение

Диссертация Голомидова Ильи Михайловича на тему «Изучение ранних нейродегенеративных процессов при наследственной форме болезни Паркинсона и поиск потенциальных агентов для терапии заболевания на модели *Drosophila melanogaster*», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7. «Генетика» является самостоятельной законченной научно-квалификационной работой, в которой решаются важные и актуальные задачи – выяснение молекулярно-генетических механизмов патогенеза болезни Паркинсона на модели

трансгенных дрозофил со встроенными генами вариантов альфа-синуклеина и глюкоцереброзидазы и анализ потенциальных средств терапии этой болезни.

По актуальности, объему выполненных исследований, научной и практической значимости диссертационная работа И.М. Голомидова полностью соответствует п.п. 9-11,13-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 г., (в редакции с изменениями, утвержденными Постановлениями Правительства РФ от 21.04.2016 № 335, ред. от 01.10.2018 № 1168, ред. от 20.03.2021 № 426), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор Голомидов Илья Михайлович заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7. «Генетика».

Отзыв обсужден и одобрен на заседании Отдела молекулярной генетики ФГБНУ «ИЭМ» 19 января 2023 г. протокол №1.

Заведующий лабораторией молекулярной
генетики человека Отдела молекулярной
генетики

Д.м.н., проф. Шавловский М.М.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины» - 197376, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д. 12, телефон для справок: (812)234-6868, электронная почта: iem@iemrams.ru, сайт института: <http://iemspb.ru>

Подпись *Шавловского М.М.* удостоверяется.
Ведущий специалист отдела кадров

19.01.2023.

