

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Вавиловой Юлии Дмитриевны «Изменение популяционного состава и характеристик системы шаперон-зависимого гомеостаза у циркулирующих клеток иммунной системы при развитии болезни Паркинсона», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – «Молекулярная биология»

Диссертационная работа Вавиловой Ю.Д. выполнена на стыке молекулярной и клеточной биологии и посвящена поиску ранних маркеров болезни Паркинсона.

Болезнь Паркинсона относится к так называемым протеотоксическим заболеваниям, т.е. тем, виновником которых выступают неправильно сложенные белки. К этому классу заболеваний относятся также болезни Альцгеймера и Гентингтона, боковой амиотрофный склероз и другие, в том числе прионные заболевания. Эффективных лекарств, способных остановить заболевание на той стадии, когда она была выявлена, в настоящее время нет. Большинство клинических случаев болезни Паркинсона не имеют генетической природы, являются спорадическими, и грустная ирония заключается в том, что болезнь начинается примерно за 30 лет до того, как проявляются первые клинические признаки. Именно поэтому поиски ранних маркеров нейродегенеративных заболеваний являются крайне актуальной задачей.

Автор сосредоточилась на системе клеточного протеостаза у циркулирующих клеток иммунной системы, а именно, на белках-шаперонах, преимущественно, из семейства HSPA и белках, участвующих в реализации аутофагии. Юлия Дмитриевна провела сравнительный анализ содержания пула белков Hsp70 и базальной экспрессии в клетках периферической крови пациентов с болезнью Паркинсона и у здоровых доноров того же возраста, провела анализ связи между внутриклеточным содержанием белков семейства Hsp70 и уровнем экспрессии белка аутофагии p62 с уровнем спонтанного

2.

апоптоза клеток РВМС. Также был проведен сравнительный анализ Т-лимфоцитов и NK-клеток периферической крови на разных стадиях дифференцировки на фоне цитомегаловирусной инфекции. В эту часть исследования была введена также группа здоровых молодых доноров. Такой подход нов и интересен.

В целом, поставленные диссертантом цель и задачи исследования соответствуют названию работы и ее содержанию. Выносимые на защиту положения аргументированы и логично вытекают из материалов диссертации. Выводы диссертационной работы логично обоснованы и полностью соответствуют поставленным задачам и полученным результатам. Исследование выполнено с соблюдением этических норм научных исследований.

Диссертационная работа Вавиловой Ю.Д. построена по общепринятому образцу, состоит из списка сокращений, введения, обзора литературы, главы «Материалы и методы», в которой описаны примененные автором методики, главы по результатам собственных исследований и обсуждения полученных результатов, выводов, и списка использованной литературы. Диссертация изложена на 100 страницах машинописного текста, содержит 6 таблиц и 22 рисунка, библиографический указатель содержит 209 современных источников. Кроме того, в диссертации есть приложение с таблицей и рисунком.

В главе «Введение» Вавилова Ю.Д. описывает научную проблему, которой посвящена работа, обсуждает ее актуальность и степень разработанности, описывает цель и задачи исследования, использованные методы, оценивает степень новизны полученных результатов, их теоретическую и практическую значимость. Этот раздел также включает информацию об апробации результатов и о печатных работах, в которых они были опубликованы (список включает 3 статьи в рецензируемых научных журналах, главу в престижном сборнике «Heat Shock Proteins and Stress» и 8 тезисов докладов на международных и российских конференциях).

Глава «Обзор литературы» автор дает исчерпывающую информацию о болезни Паркинсона, включая молекулярные механизмы развития болезни, детально описывает систему клеточного протеостаза в норме и патогенезе, дает представление об известных к настоящему времени биохимических маркерах БП в периферической крови. Отдельное внимание отводится нейровоспалению и возможной связи БП с цитомегаловирусной инфекции. В целом, литературный обзор написан хорошо, логично подводит к задачам исследования, хорошо и достаточно иллюстрирован.

Раздел «Материалы и методы» содержит обстоятельное описание проведенных экспериментов, достаточное для их воспроизведения. Надо отметить, что большинство методов знакомы специалистам, но их сочетание позволяет получить интересные и важные результаты. Особенно большое уважение вызывает подглавка «Статистическая обработка данных», в котором приведено довольно большое количество современных статистических методов.

В главе «Результаты» описание начинается с выбора антител. Юлия Дмитриевна использует два коммерчески доступных антитела, BRM-22, узнающие и Hsp70, и Hsc70, и C92F3A-5, способные узнавать только индуцибельный Hsp70. Применение BRM-22 показало сдвиг флуоресценции клеток РВМС в нормальных условиях, и еще больший сдвиг при использовании мягкого теплового шока, в то время как окраска клеток антителами C92F3A-5 не привела к сдвигу флуоресценции. Эти данные вызывают недоумение. Экспрессия Hsp70(HSPA1A) при тепловом шоке и других стрессах регулируется транскрипционным фактором HSF1, а экспрессия Hsc70 (HSPA8) имеет другой тип регуляции, не зависящий от стресса. Т.е. сдвиг флуоресценции в верхней панели мы можем объяснить повышением содержания Hsp70 в клетках РВМС, но это противоречит данным, представленным в нижней панели. Проверили ли работоспособность антител C92F3A-5, к примеру с помощью вестерн-блоттинга? В коллективе, где работает Юлия Дмитриевна, есть панель моноклональных антител, узнающих как Hsp70 (например клон 2E4, на него имеется патент) так и оба

шаперона (клон 3С5). Эти антитела довольно хорошо охарактеризованы, и использованы в публикациях в приличных журналах. Почему противоречивый результат, представленный на рис.5 не был перепроверен с помощью собственных антител?

Далее, с помощью антител BRM-22, автор показывает, что как базальный уровень Hsp70/Hsc70, так и их уровень после мягкого теплового шока выше в РВМС здоровых доноров, в то время как оценка мРНК показала, что синтез этих белков у здоровых доноров ниже, чем у пациентов с БП. Этому должна быть причина. На рис. 7 (уровень Δ Hsp70 в PMN у пациентов БП по сравнению со здоровыми донорами) нет разницы в экспрессии между пациентами БП и здоровыми донорами, а в клетках РВМС эта разница была. Какая конкретно, по мнению автора популяция клеток РВМС может вносить вклад в разницу в экспрессии белков HSP70?

Интересная часть диссертации относится к разнице в экспрессии белка аутофагии, p62, и уровня апоптоза (выше у пациентов с БП) в клетках РВМС и вывод, сделанный автором на основе данных ROS-анализа, что комбинация внутриклеточного содержания белка p62 и мРНК гена HSPA6 в клетках РВМС может рассматриваться в виде потенциальных биомаркеров для различения ранних/средних стадий БП.

Далее автор подробно рассматривает степень дифференцировки циркулирующих Т-клеток у пациентов с БП на фоне инфекции CMV и демонстрирует, что доля эффекторных Т-клеток памяти, TEMRA (CD45RA) статистически ниже у пациентов с БП (все CMV-позитивные) по сравнению с CMV-позитивными здоровыми донорами, и также, наблюдается снижение терминально дифференцированных CD57+ Т-лимфоцитов.

В главе «Обсуждение» автор дает емкий сравнительный анализ совокупности данных, имеющихся в мировой и отечественной литературе и результатов, полученных в ходе диссертационного исследования, что дает основание для полноценных выводов.

Характеризуя работу Вавиловой Ю.Д. в целом, хочу отметить, что ее выводы логически следуют из полученных данных и полностью соответствуют поставленным задачам. Сама диссертация производит очень хорошее впечатление, и хочу подчеркнуть, что полученные данные вносят существенный вклад в освещение проблем, связанных с поиском ранних маркеров болезни Паркинсона, и являются научной основой для дальнейших исследований специалистов, работающих в области молекулярной нейрпатологии, клеточной и молекулярной биологии. Замечания, высказанные в рецензии, не влияют на высокую оценку хорошей диссертационной работы. Методики адекватны поставленным задачам. Достоверность данных не вызывает сомнений; выводы, приведенные в конце работы, соответствуют ее содержанию и логично вытекают из анализа собственных данных автора; количество публикаций, напечатанных в рекомендуемых ВАК и авторитетных рецензируемых журналах, вполне достаточно.

Автореферат полностью отражает основные результаты диссертации.

Заключение

Исходя из актуальности, научной новизны и практической значимости, присущих данной работе, можно заключить, диссертационная работа Вавиловой Юлии Дмитриевны соответствует критериям (в том числе п. 9), установленным "Положением о присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; от 29.05.2017 г. № 650; 20.03.2021 г. № 426; 11.09.2021 №1539), а сам диссертант несомненно заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 - Молекулярная биология."

Официальный оппонент:

доктор биологических наук, руководитель отдела молекулярных и клеточных взаимодействий Института Цитологии Российской академии наук

Гужова Ирина Владимировна



194064, г. Санкт-Петербург, Тихорецкий проспект, 4

Тел. +7 (912) 297-18-29

E-mail: irina.guzh@gmail.com

Подпись д.б.н. Гужовой И. В.

«Удостоверяю»

Ученый секретарь Института Цитологии Российской академии наук

к.б.н. Тюряева Ирина Ивановна

«22» мая 2023 г



ЗАВЕРЯЮ

УЧЕНЫЙ СЕКРЕТАРЬ

ИНСТИТУТА ЦИТОЛОГИИ РАН, к.б.н.

ТЮРЯЕВА И.И.

