

ОТЗЫВ

официального оппонента

**на диссертационную работу на соискание ученой степени
кандидата биологических наук Мельниковой Александры Кирилловны
на тему: «Роль амилоидной трансформации α -синуклеина в нарушении
гликолиза при синуклеинопатиях»
по специальности 03.01.08 – «Биоинженерия»**

Нейродегенеративные заболевания, сопровождающиеся накоплением агрегатов α -синуклеина в нервной ткани, получили название синуклеинопатий, в состав которых входят болезнь Паркинсона, болезнь Паркинсона с деменцией, деменция с тельцами Леви, множественная системная атрофия, вызывающие у пациентов серьезные моторные и когнитивные нарушения и включенные в группу социально значимых заболеваний. Особенность структуры α -синуклеина (не формирует устойчивой третичной структуры) и отсутствие окончательной информации о его физиологической роли делает этот белок важной мишенью в изучении механизма белок-белковых взаимодействий и их роли в развитии патологических процессов. В этой связи, несомненно, большое значение имеет исследование механизма связи амилоидной агрегации α -синуклеина с возможными нарушениями клеточного метаболизма.

Данные о совместной локализации одного из важных ферментов гликолиза глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (ГАФД) с α -синуклеином в тельцах Леви наряду с данными о их возможном взаимодействии послужили одними из отправных точек в постановке целей и задач диссертационной работы Мельниковой Александры Кирилловны «Роль амилоидной трансформации α -синуклеина в нарушении гликолиза при синуклеинопатиях», направленной на изучение взаимодействия ГАФД и различных форм α -синуклеина при синуклеинопатиях, а также на поиск

ингибиторов амилоидной агрегации α -синуклеина. Учитывая важную роль синуклеинопатий среди нейродегенеративных заболеваний человека и высокую значимость исследований причин метаболических нарушений, наблюдаемых при таких патологиях, тема данной диссертационной работы, несомненно, является актуальной.

Диссертационная работа Мельниковой А.К. представляет собой научное исследование, соответствующее требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, полученных результатов и их обсуждения, заключения, основных результатов, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 299 источников. Работа изложена на 191 странице, иллюстрирована 42 рисунками и 2 таблицами. Все главы взаимосвязаны и логически последовательны.

В первой главе автор подробно анализирует литературные данные, касающиеся рассматриваемых в диссертационной работе вопросов, в том числе особенности структуры и функции α -синуклеина, механизма амилоидогенной трансформации α -синуклеина и ее взаимосвязи с синуклеинопатиями, обсуждаются токсичные формы α -синуклеина и их роль в распространении патологии. Весьма подробно рассматриваются нарушения клеточного метаболизма при синуклеинопатиях, включая нарушения митохондриального гомеостаза и путей метаболизма глюкозы. Подробно автор останавливается на известных данных о возможном механизме взаимодействия α -синуклеина и ГАФД, а также на использовании низкомолекулярных соединений для предотвращения амилоидогенной трансформации белков. Обзор достаточно широко охватывает сведения по изучаемым вопросам, хорошо иллюстрирован, легко читается и вводит читателя в круг исследуемых автором проблем, делая работу логично сформулированной.

В главе «Материалы и методы исследования» детально описаны методы, которые адекватны поставленным задачам и цели диссертационного

исследования. Мельниковой А.К. использован широкий и разносторонний набор современных методических приемов, что говорит о её высокой методической подготовленности. Для изучения различных форм α -синуклеина *in vitro* использованы: метод оценки спектра и интенсивности флуоресценции тиофлавина Т, спектроскопия кругового дихроизма, сканирующая ион-проводящая микроскопия, нативный и SDS-гель электрофорез, иммуноблоттинг. Для оценки влияния α -синуклеина на гликолитические параметры клеток нейробластомы SH-SY5Y автором были получены клетки, продуцирующие α -синуклеин дикого типа или мутантной формы A53T. В ходе работы использованы также такие методы как спектрофотометрический метод активности ГАФД, ферментативный метод оценки концентрации глюкозы и лактата, метод оценки жизнеспособности клеток по восстановлению красителя резазурина, иммуноцитохимическое окрашивание. Полученные результаты обработаны с помощью адекватных методов статистического анализа.

В главе «Результаты и их обсуждение» подробно изложены и обсуждаются данные, касающиеся получения олигомеров и фибрилл α -синуклеина, исследования инактивации ГАФД различными формами α -синуклеина *in vitro* и изменения гликолитических параметров в клетках нейробластомы SH-SY5Y, анализа амилоидной агрегации α -синуклеина и ингибирования фибриллизации α -синуклеина производными гидроксикоричных кислот.

Автором успешно разработана методика получения рекомбинантного α -синуклеина дикого типа и белка с заменой A53T, вызывающего семейную болезнь Паркинсона, и получены обогащенные олигомерами α -синуклеина фракции, содержащие мономеры, димеры и два высокомолекулярных вида олигомеров, а также фибриллы α -синуклеина. Установлено, что наибольшую инактивацию ГАФД вызывают олигомерные формы α -синуклеина по сравнению с его мономером, тогда как фибриллы не обладают инактивирующим действием.

Данные этого этапа вызвали определенные вопросы. Так, при получении обогащенных олигомерами α -синуклеина фракций Мельникова А.К. указывает на содержание небольших примесей низкомолекулярных форм. Хотелось бы уточнить, как автор оценивает процент таких примесей и их влияния на полученные результаты. Не понятно в каком виде представлены данные на рис. 23 (не указано количество повторов, нет отклонения от средней). На с. 119 автор указывает, что продукция белка α -синуклеина в клетках α -synWT была в среднем выше, чем α -synA53T и предполагает, что возможно, это связано с высокой токсичностью α -synA53T при суперпродукции для клетки. Однако в то же время на с. 121 отмечается, что продукция α -синуклеина не влияла на содержание ГАФД в клетке. Хотелось узнать, что имеет в виду автор под токсичностью α -синуклеина.

На следующем этапе работы Мельниковой А.К. с помощью трансфекции были успешно получены клетки нейробластомы SH-SY5Y, продуцирующие α -синуклеин дикого типа и с мутацией A53T. Автор демонстрирует, что клетки, стабильно продуцирующие α -синуклеин дикого типа или A53T, содержат олигомерные формы α -синуклеина. При оценке гликолитических параметров в клетках α -synWT и α -synA53T (со стабильной продукцией α -синуклеина) автор указывает на статистически значимое снижение как активности ГАФД (отмечая, что ГАФД находится в частично окисленной форме), так и скорости поглощения глюкозы и образования лактата, что свидетельствует о нарушении энергетического метаболизма. Одной из причин обнаруженных нарушений в метаболизме клеток, продуцирующих α -синуклеин, как отмечает автор, может быть взаимодействие частично окисленной ГАФД с различными формами α -синуклеина. Вместе с тем, сравнивая более существенные изменения расхода глюкозы по сравнению с изменениями продукции лактата в клетках, продуцирующих α -синуклеин, Мельникова А.К. указывает на возможное значимое для клетки нарушение регуляции пентозофосфатного пути. В этом контексте можно задать автору уточняющий вопрос о том, как она оценивает возможную инициирующую роль оксидативного стресса в амилоидной

трансформации α -синуклеина, развитие которого могут усиливать нарушения пентозофосфатного пути, способствующие снижению уровня GSH как одного из важных низкомолекулярных антиоксидантов.

Вторая часть диссертационной работы Мельниковой А.К. посвящена поиску соединений, ингибирующих амилоидную трансформацию α -синуклеина. Автором протестировано 9 синтетических и природных производных гидроксикоричных кислот, среди которых наиболее эффективно фибриллизацию α -synWT феруловая (3-метокси-4-гидроксикоричная кислота), 3-метокси-4-ацетамидоксикоричная кислота, 3,4-диметоксикоричная кислота. С помощью молекулярного докинга рассчитаны сайты возможного связывания; сделан вывод, что данные производные гидроксикоричной кислоты связываются с промежуточными формами, образующимися при агрегации α -синуклеина, но не с его мономером. Автор указывает, что подобное ингибирование агрегации с образованием неамилоидных агрегатов меньшего размера потенциально применимо и для нарушения взаимодействия ГАФД с различными формами α -синуклеина, приводящего к нарушению протекания гликолиза.

Представленные в диссертации результаты получены на достоверном количестве экспериментального материала. Научная новизна и достоверность полученных в диссертации данных не вызывает сомнений. Выводы соответствуют полученным результатам.

Указанные выше замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 03.01.08 – «Биоинженерия» (по биологическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова, а также оформлена, согласно приложениям № 5, 6 Положения о

диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Мельникова Александра Кирилловна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.08 – «Биоинженерия».

Официальный оппонент:

доктор биологических наук,
профессор кафедры биохимии имени академика Березова Т.Т.,
Медицинский институт, Федеральное государственное
автономное образовательное учреждение высшего образования
«Российский университет дружбы народов»

Калинина Елена Валентиновна



11.06.2021

Контактные данные:

тел.: тел 8(495)7873803 доб.1987; e-mail: kalinina_ev@rudn.ru
Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация: 03.01.04 - Биохимия

Адрес места работы: 117198, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 8

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования «Российский университет дружбы народов»,
Медицинский институт,
тел.: 8(495)7873803 доб.1987; e-mail: kalinina_ev@rudn.ru

Подпись д.б.н. Калининой Е.В.

Ученый секретарь медицин
к.фарм.н., доцент
14.06.2021



Т.В. Максимова