

ОТЗЫВ

оппонента д.б.н., профессора Мухиной Ирины Васильевны на диссертационную работу Липиной Татьяны Викторовны на тему: «Вклад точечной мутации гена *disc1* (disrupted-in-schizophrenia-1) в патогенез шизофрении: экспериментальное исследование», представленной на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.03.01 – физиология

Актуальность проведенного исследования. Диссертационная работа Липиной Т.В. посвящена актуальному вопросу физиологии, в частности, нейрофизиологии – изучению физиологических основ психической деятельности человека, в частности при изменении регуляции нейрогенеза в пренатальном периоде, а также разработке новых методов исследований функций животных и человека.

Несмотря на повышенный интерес ученых и медиков к изучению механизмов шизофрении, которая является хроническим психическим заболеванием, затрагивающим ~ 1% населения во всем мире и характеризующимся нарушением когнитивных и эмоциональных функций, остаются неизученными причины возникновения шизофрении.

Например, нет ясного понимания роли генетических элементов в совокупности с психопатогенными факторами окружающей среды, что в целом нарушает формирование мозга и способствует в дальнейшем проявлению симптомов шизофрении во взрослом состоянии.

Не ясной остается и роль многих генов, связанных с возникновением шизофрении в разных популяциях людей, в частности *DISC1* (Disrupted-In-Schizophrenia-1), мутации которых приводят к формированию белков с нарушенными внутриклеточными функциями. На момент постановки автором диссертации цели было уже известно, что С-конец *DISC1* взаимодействует с двумя важными белками - PDE4 и гликоген синтаз киназой-3 (GSK-3), которые являются внутриклеточными регуляторами активности дофаминовых рецепторов 2го типа (D2), лежащими в основе дофаминовой теории шизофрении. В то время функциональная роль N-конца *DISC1* оставалась неизученной. Кроме того, на момент инициации данного исследования, экспериментальных *in vivo* моделей для изучения вклада межбелковых взаимодействий N-конца *DISC1* в механизмы шизофрении не существовало. Эти данные послужили основанием для гипотезы автора, что генетическая модификация 2го экзона гена *DISC1* у мышей, кодирующего N-конец *DISC1*, позволит оценить его вклад в межбелковые взаимодействия и патогенез шизофрении на экспериментальной модели *in vivo*.

Все эти вопросы легли в основу цели научной работы диссертанта, которая была сформулирована следующим образом - исследование вклада гена *DISC1* с точечной мутацией во 2м экзоне, модифицирующей N-конец белка, в механизмы

шизофрении на экспериментальной *in vivo* модели мышей для выявления новых биомаркеров и терапевтических мишеней.

В качестве объективных методов, оценивающих механизмы развития шизофреноподобного фенотипа у животных в эксперименте, были выбраны адекватные физиологические, биохимические, генетические, молекулярно-биологические подходы. Перед автором были поставлены четкие задачи для решения выбранной цели, которые он и решил в ходе выполнения диссертационной работы.

Научная новизна исследования, теоретическая и практическая значимость полученных результатов, сформулированных в диссертации.

Автором диссертационного исследования вынесены на защиту следующие основные положения: (1) Создана генетическая линия мышей 100P/100P с точечной мутацией *DISC1* Rgsc1390 во 2м экзоне гена *DISC1*, которая соответствует основным критериям экспериментальной модели шизофрении, согласно этиологии; сходству симптомов; нейробиологическим изменениям и терапевтическому ответу на антипсихотики; (2) Нарушение взаимодействий между *DISC1*-L100P протеина с GSK-3, PDE4B и D2 рецепторами вовлечено в биохимические механизмы шизофреноподобного поведения мутантных 100P/100P мышей; (3)

Материнская иммунная активация посредством провоспалительного цитокина интерлейкина-6 (ИЛ-6) опосредует шизофреноподобное поведение у гетерозиготных мышей 100P/+.

Для доказательства данных положений автором были получены следующие новые факты и разработаны гипотезы: (1) Впервые создана генетическая линия мышей с точечной мутацией во 2м экзоне гена *DISC1*, приводящей к замене лейцина на пролин в позиции 100 аминокислоты протеина *DISC1* (линия *DISC1*-L100P; 100P/100P); (2) Данные биохимического анализа обнаружили пониженное связывание мутированного *DISC1*-L100P протеина с фосфодиэстеразой-4B (PDE4B) и гликоген-синтаз киназой-3 (GSK-3), вместе с повышенным взаимодействием с дофаминовыми рецепторами 2го типа (D2). Было предположено, что *DISC1* регулирует функциональность D2 рецепторов и, соответственно, функционирование дофаминовой системы головного мозга. Впервые обнаружено наличие функционального взаимодействия между *DISC1* и D2 рецепторами. Установлены антипсихотические свойства пептида, разрывающего взаимодействия между *DISC1* и D2 рецепторами, корректируя шизофреноподобное поведение у 100P/100P мышей; (3) Показано взаимодействие между генетической предрасположенностью к шизофреноподобному поведению у гетерозиготных 100P/+ мышей и внутриутробной материнской иммунной активацией (МИА), а также вклад провоспалительного цитокина, интерлейкина-6 (ИЛ-6), в патогенез шизофреноподобного поведения на гибридной модели 100P/+ х МИА,

свидетельствуя о патогенности 100P мутации; (4) На генетической модели 100P/100P установлена отставленная манифестация шизофреноподобного поведения в возрасте 12-16 недель; (5) По данным транскриптомного анализа отделов головного мозга идентифицирован глиатрансммиттер липокалин-2 (Lcn2), вовлечённый в эффекты 100P мутации, вальпроата и их совместном взаимодействии. Выдвинута гипотеза, что Lcn2 может являться молекулярным индексом ранней диагностики шизофрении, а также терапевтической мишенью для создания превентивной терапии данного заболевания

Результаты исследования расширяют представления о новых молекулярных механизмах шизофрении, что открывает новые перспективы по разработке и созданию новых лекарственных препаратов, поиску новых терапевтических мишеней и маркеров заболевания. Созданная автором генетическая линия 100P/100P может быть использована для исследований молекулярно-клеточных и нейробиологических механизмов шизофрении, связанных с нарушением нейроразвития, а также дофаминергической системы головного мозга.

Теоретические положения исследования могут быть использованы в курсах лекций для студентов биологических и медицинских факультетов ВУЗов.

Диссертация традиционно изложена на 219 страницах машинописного текста и состоит из введения, описания материалов и методов, 4 основных глав, обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, включающего 567 различных источников, приложения, иллюстрирована 7 таблицами и 45 рисунками.

Обзор литературы представлен на 46 страницах и включает основные положения, разработанные в литературе о природе шизофрении, функции белка DISC1, его взаимосвязи с другими белками и внутриклеточным сигналингом, о моделях шизофрении и маркерах раннего шизофреноподобного поведения. Обзор написан грамотно, демонстрирует эрудицию автора в изучаемой проблеме, литературные данные представлены в логической цепочке, позволяющей сделать наиболее полное заключение о состоянии проблемы в науке по выбранному направлению. В конце главы 2 автор делает общее заключение по результатам литературного поиска, что облегчает понимание новизны диссертационного исследования и правильности постановки цели и задач исследования.

Материалы и методы. В исследовании были использованы самцы генетических линий DISC1-Q31L (гомозиготные мыши 31L/31L), DISC1-L100P (гомозиготные мыши 100P/100P) и самцы дикого типа (инбредная линия C57BL/6NCrl; wild-type; WT; +/+) в возрасте 2,5 - 4 мес. В поведенческих тестах использовали тесты, позволяющие оценить эмоционально-тревожное, социальное и когнитивное поведение. Биохимические методы включали вестерн блоттинг, коиммунопреципитацию, высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ), *in vivo* микродиализ, иммуноферментный анализ, анализ экспрессии генов с помощью микрочипов, иммуногистохимию с последующей конфокальной

микроскопией. Фармакологическое тестирование включало введение агонистов и антагонистов рецепторов, заинтересованных в механизмах шизофреноподобного поведения, а также введение стимулятора материнской иммунной системы PolyI:C и антител к интерлейкину-6 (ИЛ-6).

Статистическую обработку проводили с использованием пакета программ Statistical10. Поведенческие данные были проанализированы с помощью одно- и двухфакторного анализа ANOVA, с повторными измерениями, где необходимо, и дальнейшим ретроспективным (post-hoc) анализом (LSD критерий Фишера). Морфометрические данные анализировали с помощью *t*-критерия Стьюдента

Результаты и их обсуждение. Автором очень детально и логически представлены результаты исследования в 4-х экспериментальных разделах, которые имеют четкую структуру: небольшое введение в качестве предполагаемой гипотезы, которую автор доказывает или опровергает в последующих исследованиях, результаты, краткое заключение.

В первом экспериментальном разделе (глава 4) автор изучает фенотип DISC1 мутантных мышей. По результатам фармако-поведенческого анализа делается заключение о наличии шизофреноподобного поведения у мышей линии 100P/100P и депрессивно-подобного поведения у 31L/31L мутантных животных. Автором предполагается, что действие каждой точечной мутации во 2-м экзоне гена DISC1, по-видимому, вызывает специфичные биохимические изменения, приводящие к тому или иному типу психопатологии. Поэтому на следующем этапе исследования диссертантом исследуются биохимические особенности, приводящие к шизофреноподобному поведению у мышей линии 100P/100P.

Во втором экспериментальном разделе (глава 5) изучаются биохимические особенности, приводящие к шизофреноподобному поведению у мышей линии 100P/100P. Автором идентифицирована повышенная функциональность дофаминергической системы, вызванная нарушением взаимодействий между DISC1-L100P с D2 рецепторами, а также PDE4B и GSK-3, что в свою очередь также повышало ферментативную активность GSK-3 и повышенным количеством D2 рецепторов в высокочувствительном состоянии в стриатуме 100P/100P мутантов, отражающее, по-видимому, последствия нарушения работы DISC1 интерактома, и являющейся причиной повышенной фармакологической чувствительности к амфетамину у мышей данной генетической линии. Кроме того, обнаружено, что блокаторы PDE4B и GSK-3, а также TAT-D2R-пептид оказывают антипсихотические эффекты, корректируя шизофреноподобное поведение 100P/100P мышей. Показан синергистический эффект *in vivo* между блокаторами PDE4B и GSK-3 на 100P/100P мутантах, демонстрируя их совместную внутриклеточную функциональность в ассоциации с DISC1.

В третьем экспериментальном разделе (глава 6) представлены результаты изучения взаимодействия между генетической предрасположенностью к

шизофреноподобному поведению (100p/+) и материнской иммунной активацией (миа): гибридная (ген x среда) модель шизофрении. Автором продемонстрирована специфичность и патогенность точечной мутации DISC1-L100P, имеющей отношение к психопатологическим процессам шизофреноподобного состояния. Полученные данные доказали роль DISC1-L100P в процессах эмбрионального нейrogenеза, учитывая воздействие МИА на ранней стадии эмбриогенеза. Показано, что МИА посредством провоспалительного цитокина ИЛ-6 опосредует шизофреноподобное поведение у 100P/+ гетерозиготных мышей. Таким образом, комбинация 100P/+ с МИА у мышей представляет собой новую гибридную модель шизофрении, сочетая два этиологических фактора данного заболевания, и в большей степени соответствуя ситуации в человеческой популяции.

В четвертом экспериментальном разделе (глава 7) исследованы молекулярно-клеточный анализ эффектов вальпроата на шизофреноподобные эндотипы 100P/100P мышей. Полученные результаты продемонстрировали: 1) нарушение поведения у 100P/100P мышей к 12й недели жизни, но не в возрасте 8 недель; 2) хроническое введение вальпроата до начала проявления шизофреноподобного поведения предотвращало нарушение поведения у 100P/100P мутантных мышей; 3) у 100P/100P мышей наблюдалось больше глиальных клеток в обонятельных луковицах, ростромиграционном тракте и субвентрикулярной зоне, но не субгранулярной зоне гиппокампа, что корректировалось вальпроатом; 4) генетическая инактивация *Lcn2* корректировала повышенное количество глиальных клеток и шизофреноподобное поведение у 100P/100P мышей.

В целом в описании результатов прослеживается логика изложения, написано грамотно. Автор, обсуждая результаты и делая выводы, предлагал гипотезы с использованием большого количества цитируемой литературы, что позволило ему выдвинуть ряд предположений, логически вытекающих из собственных данных и данных литературы. Комплексное исследование на 100P/100P генетической линии мышей позволило заключить автору диссертационного исследования, что данная линия мышей является перспективной моделью шизофрении, исследования на которой позволят выявить новые молекулярно-клеточные и нейробиологические механизмы данного заболевания, что приведет к идентификации новых биомаркеров шизофрении, а также мишеней для превентивных и терапевтических воздействий.

Замечания: В работе используется термин глатрансмиттер, тогда как наиболее частое написание этого термина встречается при точном переводе с английского языка – глиотрансмиттер.

Кроме того, по тексту встречаются грамматические и стилистические ошибки.

Вопросы:

1. На основании какого материала автором было сделано заключение, что повышенная экспрессия *Lcn2* в стволе головного мозга у 100P/100P

мутантов, существенно корректируемая вальпроатом, вовлечена в регуляцию нейроглиальных взаимоотношений, а сам *Lcn2* является глиотрансмиттером?

2. Каков предположительно физиологический механизм корригирующего или превентивного действия вальпроата на основании ваших исследований и данных литературы?

Заключение. В конце диссертационной работы в главе 8 автор делает расширенное обсуждение полученных результатов, позволяющее сжато представить обсужденные результаты, сравнить с полученными результатами других авторов, выдвинуть гипотезы и предположения. Перед выводами автор делает короткое заключение, которое финализирует обсуждение полученных результатов общей схемой, иллюстрирующей основные результаты, полученные в ходе выполнения диссертационной работы.

Выводы. По результатам диссертационной работы автором было сделано 7 выводов. В целом выводы соответствуют поставленным задачам.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, личный вклад автора

Научные положения диссертационной работы Липиной Т.В. обоснованы большим количеством и разнообразием экспериментальных моделей и методов исследования. Положения и выводы диссертационной работы сформулированы на основе полученных результатов и полностью отвечают поставленным задачам, а исследование соответствует паспорту специальности физиология в области изучения физиологических основ психической деятельности человека, в частности при изменении регуляции нейрогенеза в пренатальном периоде, а также разработке новых методов исследований функций животных и человека.

Текст автореферата изложен в хорошем стиле, свидетельствует о высокой квалификации автора и соответствует содержанию диссертационной работы. Замечаний к содержанию автореферата, снижающих научную и практическую значимость работы, не выявлено. Основные результаты диссертации представлены в 15 высокоимпактных печатных работах, в том числе в журналах, рекомендованных ВАК для защиты докторских диссертаций, 1 монографии и 3 главах в монографиях. Не вызывает сомнений личный вклад автора в планирование, выполнение исследований, обработку материала, анализ и написание статей.

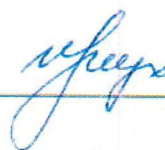
В целом, сделанные замечания и заданные вопросы не умаляют значение диссертационной работы.

Заключение. Диссертационная работа Липиной Татьяны Викторовны «Вклад точечной мутации гена *disc1* (disrupted-in-schizophrenia-1) в патогенез шизофрении:

экспериментальное исследование» является законченным научным исследованием, развивающим новое научное направление в области физиологии, включающим выявленные новые принципиальные факты, гипотезы и закономерности развития шизофреноподобного состояния в экспериментальной модели на мышах при изменении раннего нейрогенеза.

Диссертационная работа Липиной Татьяны Викторовны «Вклад точечной мутации гена *disc1* (disrupted-in-schizophrenia-1) в патогенез шизофрении: экспериментальное исследование» соответствует требованиям п.9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением правительства РФ от 24 сентября 2013 г. за №842 (с изменениями в редакции постановлений Правительства РФ №335 от 21.04.2016, №748 от 02.08.2016), а ее автор заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.03.01 – физиология.

Заведующий кафедрой нормальной физиологии
им. Н.Ю. Беленкова и директор Института
фундаментальной медицины федерального
государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего
образования «Приволжский исследовательский
медицинский университет» Министерства
здравоохранения Российской Федерации,
6030005, Нижний Новгород, пл. Минина и
Пожарского, 10/1,
доктор биологических наук, профессор
Мухина Ирина Васильевна
mukhinaiv@mail.ru



Подпись Мухиной И.В. заверяю
Ученый секретарь федерального государственного
бюджетного образовательного учреждения высшего
образования «Приволжский исследовательский
медицинский университет» Министерства
здравоохранения Российской Федерации,
д.б.н. Андреева Н.Н.

30.05.2018