

## Отзыв

официального оппонента на диссертацию Липиной Татьяны Викторовны «Вклад точечной мутации гена DISC1 (disrupted-in-schizophrenia-1) в патогенез шизофрении: экспериментальное исследование», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.03.01 – «физиология»

### Актуальность темы диссертации

В фокусе диссертационного исследования Т.В. Липиной – молекулярные механизмы развития шизофрении с участием белка-продукта гена DISC1. Актуальность исследования обусловлена тем, что несмотря на значительный прогресс, достигнутый в последние десятилетия в понимании механизмов развития головного мозга в (пато)физиологических условиях, в расшифровке механизмов нейропластичности, формирующих сложные формы поведения, когницию и память, а также в идентификации новых молекул-мишеней для фармакологической коррекции заболеваний, ассоциированных с поведенческими нарушениями, по-прежнему отсутствует научная теория, успешно интегрирующая существующие представления о механизмах развития таких тяжелых нейropsychических расстройств, как шизофрения, аутизм, депрессия. В этом контексте формирование поведенческого фенотипа, характерного для шизофрении, вследствие мутации одного гена, кодирующего белок с множеством функций, определяющих эффективность механизмов нейrogenеза, синаптической передачи, митохондриального метаболизма, является основой для разработки моделей развития шизофрении, пригодных не только для изучения молекулярного патогенеза, но и для разработки эффективных протоколов фармакотерапии. С этой точки зрения, исследовательская стратегия, положенная в основу диссертации Т.В. Липиной, не только современна и актуальна, но и обеспечивает получение результатов с большим внедренческим потенциалом.

Считаю важным отметить то, что в своей работе автору удалось совместить «частное» и «общее» в изучении механизмов развития шизофрении у экспериментальных животных: с одной стороны, акцент сделан на

идентификацию последствий нарушений экспрессии гена DISC1, что, казалось бы, должно вносить весьма ограниченный вклад в понимание общего патогенеза этого заболевания (с учетом наличия более 100 генов-кандидатов), с другой стороны, идентификация целого спектра нарушенных межбелковых взаимодействий и функциональных последствий (дизрегуляция нейрогенеза, нарушения дофаминергической регуляции и пр.) позволяет автору сформировать оригинальный и целостный взгляд на причины возникновения шизофрении при экспрессии в клетках мозга одного мутантного белка.

В основе работы Т.В. Липиной – концепция нарушения развития головного мозга, формирование феномена т.н. «раннего программирования», оказывающего важное влияние на функционирование мозга в отдаленные периоды онтогенеза, что само по себе не может не приветствоваться в качестве базовой концепции при формировании дизайна исследования. Для экспериментальной проверки этой концепции автором предложена новая генетическая модель шизофрении на животных, воспроизводящая ключевые патобиохимические, функциональные, в том числе поведенческие, расстройства. Таким образом, представленная работа актуальна не только по поставленным цели и задачам, решение которых значимо с общебиологической и медицинской точек зрения, но и по своей методологической составляющей, которая, без сомнения, может стать хорошим примером при планировании исследовательских работ по схожей проблематике.

### **Новизна проведенных исследований и полученных результатов**

Автор применил широкий спектр современных исследовательских методов и протоколов (молекулярно-генетические, биохимические, иммуногистохимические, физико-химические, поведенческие, фармакологические тесты), что позволило получить результаты, обладающие несомненной научной новизной.

Так, Т.В. Липиной впервые созданы и использованы в экспериментах две генетические линии мышей, несущих точечные мутации во втором экзоне гена

DISC1, кодирующего N-конец белка DISC1 – DISC1-Q31L (31L/31L) и DISC1-L100P (100P/100P), для последней мутации впервые установлена специфичность в плане формирования шизофреноподобных нейробиохимических и поведенческих нарушений. Впервые убедительно показано, что экспрессия мутантной формы белка DISC1 приводит к гиперактивации дофаминергической сигнальной трансдукции, повышению активности сопряженных белков, участвующих в регуляции каскадов фосфорилирования в клетках и ряда метаболических процессов (PDE4B, GSK3). Обнаружены регион-специфические закономерности нарушения экспрессии гена DISC1. Установлено, что характерные поведенческие расстройства проявлялись у животных после 12 недели развития на фоне экспрессии мутантной формы DISC1, что соответствует особенностям клинической манифестации шизофрении у людей, и что автор объясняет с позиции нарушения глиальных механизмов регуляции нейрональной активности и постнатального нейрогенеза.

Т.В. Липиной продемонстрировано, что проявлению соответствующего поведенческого фенотипа у животных с мутантной формой гена способствует увеличение продукции ИЛ-6 при иммунном ответе и активация глии, что определяет развитие нейровоспаления в ткани головного мозга. Важным является то, что автору удалось дифференцировать эффекты индуктора воспаления в присутствии и в отсутствие дефектной DISC1-опосредованной сигнализации, и показать, что т.н. материнская иммунная активация обеспечивает формирование шизофреноподобного фенотипа у потомства при наличии мутантной формы белка DISC1. Эти данные позволили автору впервые предложить «гибридную» модель шизофрении (дефектный DISC1 в сочетании с действием индукторов материнской иммунной активации), что значительно приближает к пониманию комплексного патогенеза шизофрении, обусловленной как генетически детерминированными факторами, так и влиянием факторов окружающей среды во внутриутробном периоде развития.

Интересной находкой автора является экспериментальное доказательство существования функционального взаимодействия между DISC1 и D2 дофаминовыми рецепторами, нарушенного при экспрессии DISC1-L100P, что критически важно для интеграции новых данных о роли нарушенной экспрессии DISC1 в существующую дофаминергическую теорию возникновения шизофрении. Не менее важным следует считать обнаружение автором повышенной экспрессии D2 дофаминовых рецепторов в стриатуме 100P/100P мутантных мышей, что предполагает наличие механизма увеличения дофаминергических влияний при генетически обусловленной дисфункции DISC1 (при отсутствии избыточной продукции дофамина).

Автором впервые экспериментально установлено, что молекулы, функционально сопряженные с DISC1 белком, являются мишенями для фармакологической коррекции нейроповеденческих расстройств, характерных для шизофрении, причем часть из таргетных соединений (ингибиторы PDE4B, GSK3) проявляют выраженный синергичный эффект. Впервые установлены интересные корригирующие (антипсихотические) эффекты анти-ИЛ-6 антител, пептида, нарушающего взаимодействия между DISC1 и D2 дофаминергическими рецепторами.

В целом, научная новизна исследования заключается в успешном создании новой генетической модели шизофрении на экспериментальных животных и ее использовании для получения информации о неизвестных ранее звеньях молекулярного патогенеза этого заболевания. В связи с этим полученные результаты имеют важное теоретическое значение, так как расширяют существующие представления о механизмах развития головного мозга в норме и при патологии. Не менее важным является прикладное значение результатов исследования Т.В. Липиной, определяемое возможностью их применения при разработке новых фармакотерапевтических подходов при шизофрении (препараты с антипсихотической активностью), а также при создании новых экспериментальных моделей заболеваний головного мозга на животных.

В целом, полученные результаты позволили Т.В. Липиной сформулировать и доказать новые представления о молекулярных механизмах развития шизофрении и реализовать оригинальные подходы к их моделированию и коррекции.

### **Степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов, рекомендаций и заключений**

Достоверность результатов диссертации Т.В. Липиной подтверждается логичным и хорошо продуманным дизайном исследования, комплексным подходом к решению исследовательских задач, применением взаимодополняющих методов и протоколов, использованием нескольких экспериментальных моделей, протоколов *in vivo* и *in vitro*, адекватных групп контроля и сравнения, обоснованных методов статистического анализа полученных данных, достаточным объемом выборки.

Положения, выносимые на защиту, выводы полностью соответствуют полученным результатам, свидетельствуют о достижении цели и решении заявленных в работе задач. Результаты представлены на российских и международных конференциях, в полной мере опубликованы в ведущих международных профильных журналах, входящих в базы данных Web of Science/Scopus.

### **Значимость результатов, полученных в диссертации, для науки и практики**

Значимость полученных результатов диссертационного исследования для науки (физиология, патологическая физиология, нейробиология) определяется тем, что автором установлены новые механизмы участия белка-продукта гена DISC1 в регуляции развития головного мозга в физиологических условиях и их нарушения при шизофрении; представлены новые экспериментальные подходы к моделированию шизофрении у лабораторных животных (генетическая и гибридная модели); продемонстрированы возможности использования заявленного методического подхода к изучению проявлений

шизофреноподобного фенотипа на разных этапах онтогенеза, а также в тесной взаимосвязи с процессами развития головного мозга и нейропластичности.

Значимость полученных результатов для практики (психиатрия) определяется тем, что автором продемонстрирована эффективность применения молекул, функционально сопряженных с DISC1, в качестве мишеней для действия препаратов с потенциальным корригирующим эффектом в отношении патобиохимических и поведенческих проявлений шизофрении; продемонстрирована интеграция генетически обусловленных механизмов и влияния иммунного ответа, индуцированного действием провоспалительных стимулов, в патогенезе шизофрении, что сообщает новые возможности в предупреждении нарушений развития головного мозга в антенатальном и постнатальном периодах развития.

### **Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы**

Результаты диссертационной работы Т.В. Липиной могут быть рекомендованы к использованию в следующих областях: 1) физиология, нейробиология, патофизиология, фундаментальная медицина, системная биология (при изучении механизмов развития и повреждения головного мозга, оценке интерактома головного мозга, расшифровке механизмов нейропластичности); 2) нейрофармакология, психиатрия, профилактическая медицина (при разработке новых фармакотерапевтических протоколов, рекомендаций по профилактике и реабилитации); 3) медицинская биотехнология (при разработке новых экспериментальных моделей нейропсихических заболеваний); 4) высшем биологическом и медицинском образовании (при обучении по дисциплинам «физиология», «патологическая физиология», «биоинженерия», «психиатрия», «фармакология», «нейробиология»). В совокупности это может быть реализовано в академических институтах соответствующей специализации, в «классических» и медицинских университетах Российской Федерации.



**Оценивая содержание диссертации в целом**, хочу отметить, что ее автор демонстрирует отличное владение материалом, грамотно и логично излагает данные литературы и собственные результаты. Диссертация читается с большим интересом, она содержит большое количество рисунков, иллюстрирующих полученные данные. Обзор литературы, несмотря на достаточно большой объем, не «утяжеляет» работу, а напротив, формирует исчерпывающее представление о проблематике исследования и подтверждает высокий уровень научной квалификации автора. Разделы диссертации, посвященные описанию материалов и методов, подробны, детализированы, подтверждают комплексный подход к решению заявленных исследовательских задач. Достоинством работы следует признать наличие резюмирующих фрагментов по окончании каждой из глав собственных результатов исследования. Обсуждение полученных результатов выстроено логично, структурировано с учетом анализа разных аспектов последующего практического их применения, дополнено оригинальной схемой патогенеза шизофрении. В целом, автор при выполнении работы продемонстрировал себя в качестве самостоятельного исследователя, владеющего современными методическими приемами и умеющего выполнять комплексные научные проекты.

Автореферат отражает содержание диссертации, основные ее разделы и положения, отвечающие паспорту специальности 03.03.01 – «физиология». Оформление диссертации и автореферата соответствует установленным требованиям.

К работе имею **замечания непринципиального характера**: 1) в работе достаточно часто встречаются неудачные термины, являющиеся следствием прямого перевода англоязычных терминов (например, гликоген синтаз киназа, а не киназа гликогенсинтазы, посмертных, а не посмертных, нейроразвитие, а не развитие головного мозга, продольные (лонгитюдные) исследования, а не лонгитудинальные исследования, ростромиграторный путь, а не ростральный

миграционный путь, реципрокный анализ, а не взаимный/перекрестный анализ, хэндлирование животных, а не обращение с животными и пр.); 2) в тексте работы встречаются опечатки и – в некоторых местах – неудачное форматирование зоны рисунков. Однако указанные замечания несколько не умаляют общего положительного впечатления от работы.

Предлагаю автору следующие **вопросы в формате научной дискуссии** по проблематике работы:

1) Какова, по мнению автора, роль нарушения баланса возбуждения и торможения (E/I balance) в генезе шизофрении, связанной с экспрессией мутантной формы белка DISC1?

2) Как автор объясняет увеличение количества GFAP-иммунопозитивных клеток в нейрогенных нишах головного мозга у 100P/100P мышей, принимая во внимание факт экспрессии этого белка не только в клетках астроглии (что находит свое отражение в представленном автором обсуждении), но и в нейральных стволовых и прогениторных клетках?

3) Каковы, по мнению автора, последствия изменения активности GSK-3 при экспрессии мутантной формы DISC1, для метаболизма клеток нейрональной природы, с учетом значимой роли киназы гликогенсинтазы в регуляции внутриклеточной утилизации глюкозы и упомянутыми автором данными о нарушении метаболизма глюкозы в головном мозге при дисфункции дофаминергической системы (модель с гиперэкспрессией D2 рецепторов в стриатуме)?

4) Можно ли экстраполировать данные, полученные автором при применении poly(I:C), на эффекты ЛПС как известного индуктора провоспалительного ответа астроглии, приводящего к гиперпродукции ИЛ-6, при развитии нейровоспаления на фоне эффектов мутантной формы DISC1? Иными словами, может ли это уравнивать патогенетическую значимость воспаления бактериальной и вирусной природы при нарушениях развития головного мозга, приводящих к формированию шизофреноподобного поведенческого фенотипа?



## Заключение

Диссертация Липиной Татьяны Викторовны «Вклад точечной мутации гена DISC1 (disrupted-in-schizophrenia-1) в патогенез шизофрении: экспериментальное исследование» выполнена на высоком научно-исследовательском уровне и представляет собой законченную научно-квалификационную работу, решившую актуальную научную проблему идентификации новых молекулярных механизмов развития головного мозга при формировании шизофреноподобного поведения, а также разработки новых экспериментальных моделей шизофрении на животных, что имеет существенное значение для физиологии. По актуальности темы, степени обоснованности научных положений, сформулированных выводов, достоверности полученных данных, научной новизне, теоретической и практической значимости представленная диссертация полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842, предъявляемым к докторским диссертациям, а ее автор – Липина Татьяна Викторовна - заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.03.01 – «физиология»

Официальный оппонент:

главный научный сотрудник и руководитель  
НИИ молекулярной медицины и патобиохимии,  
заведующая кафедрой биологической химии  
с курсом медицинской, фармацевтической  
и токсикологической химии,  
проректор по инновационному развитию  
и международной деятельности  
ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого  
Минздрава России, доктор медицинских наук,  
профессор

 Алла Борисовна Салмина

« 30 » \_\_\_\_\_ 2018 г.

Подпись проф. Салминой А.Б. подтверждаю.  
Начальник Управления кадров ФГБОУ ВО  
КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого

 Д.В. Челнаков

Салмина Алла Борисовна, д-р мед. наук (14.03.03 – патологическая физиология), профессор по кафедре патологической физиологии с курсом функциональной диагностики, главный научный сотрудник и руководитель НИИ молекулярной медицины и патобиохимии, заведующая кафедрой биологической химии с курсом медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, проректор по инновационному развитию и международной деятельности федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования "Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого" Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России); 660022, Красноярский край, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, дом 1, [allasalmina@mail.ru](mailto:allasalmina@mail.ru), телефон +7 (391) 228 07 69.