

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора медицинских наук, профессора, главного научного сотрудника лаборатории нейробиологии и основ развития мозга Федерального государственного автономного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения Российской Федерации Всеволода Григорьевича Пинелиса на диссертацию Екатерины Андреевны Лысиковой «Новая модель фронто-темпоральной деменции на трансгенных мышцах с медленно прогрессирующей FUS-протеинопатией», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 14.03.03 – патологическая физиология и 03.01.04 – биохимия.

Диссертационная работа Екатерины Андреевны Лысиковой «Новая модель фронто-темпоральной деменции на трансгенных мышцах с медленно прогрессирующей FUS-протеинопатией» является актуальной, прежде всего потому, что, несмотря на интенсивные исследования, проблемы механизмов возникновения, развития, а тем более адекватной терапии БАС и ФТД окончательно не установлены. Это 2 тяжелых генетически обусловленных заболеваний. Современные успехи генетики способствовали не только установлению точного места нарушения в структуре гена, выявлению экспрессии определенных белков, но и позволили изучать процессы патогенеза генетических заболеваний на созданных мутагенных линиях различных генетических заболеваний. Это в полной мере относится к БАС и ФТД. Если для БАС существуют мутантные линии мышей, то для ФТД таких линий нет. Однако, создание адекватных моделей ФТД, которые позволят оптимизировать выявление и исследование основных каскадных механизмов, приводящих к поражению нейронов коры головного мозга при FUS-протеинопатии, остается актуальной задачей биомедицинской науки. Ее решение откроет перспективы для определения

молекулярных мишеней при разработке стратегии патогенетической терапии ФТД. Именно поэтому работа Е.А. Лысиковой, является актуальной.

Научно-практическая значимость работы определяется установлением следующих основных закономерностей:

1. Впервые получены и исследованы трансгенные животные, у которых в экспериментальных условиях произошло инвертирование характерного для оригинальной линии tg_hFUS[1-359] фенотипа БАС на фенотип ФТД.

2. Анализ результатов, полученных с помощью современного метода секвенирования РНК, позволило впервые определить группы генов с повышенной и пониженной экспрессией, которые в последующем могут быть исследованы в дальнейшем как молекулярные мишени при разработке терапии FUS-протеинопатии.

3. Определена хромосомная локализация трансгенной кассеты в геноме L-FUS[1-359] и tg_hFUS[1-359] мышей и установлено, что инвертирование фенотипа связано с изменением хромосомной локализации трансгенной кассеты при не измененной ее копияности.

4. На основании сравнительного анализа транскриптомов тканей спинного мозга L-FUS[1-359] и контрольных животных дикого типа, были идентифицированы группы генов и кодируемые ими белки, возможно участвующие в собственных внутриклеточных защитных механизмах подавления FUS-протеинопатии.

5. Анализ когнитивной функции L-FUS[1-359] мышей выявил нарушения в виде увеличенной импульсивности, сниженной тревожности, а также нарушения формирования долговременной памяти и уменьшение социального интереса, которые соответствуют ключевым характеристикам фенотипа ФТД.

6. Не вызывает сомнения практическая значимость работы, так как полученные результаты вносят весомый вклад в понимание механизмов развития

ФТД. В результате проведенной работы определены мишени для последующего скрининга лекарственных средств.

7. Необходимо подчеркнуть Высокий методический уровень проведенных исследований, начиная от получения мутантных мышей, их фенотипирования, проведения анализа транскриптомы, и вплоть до оценки когнитивных функций и морфологического анализа.

Степень достоверности результатов проведенного исследования и их апробация.

Обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций работы не вызывает сомнений и подтверждается достаточным объемом набранного материала, адекватной современной статистической обработке с выбором параметрических и непараметрических компонент.

Материалы диссертации представлены в 15-ти научных работах, в том числе опубликовано 3 статьи в рецензируемых научных журналах и 12 тезисов докладов. Автореферат и опубликованные работы полностью отражают основные положения диссертации.

Структура диссертации и качество оформления.

Диссертация Е.А. Лысиковой построена по традиционной схеме и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения полученных результатов работы и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 136 страницах, содержит 25 рисунков и 2 таблицы. Список литературы включает 253 научные публикации, из которых 16 в отечественных изданиях и 237 – в зарубежных.

В разделе «Введение» автор обосновывает актуальность исследования, четко формулирует цель и задачи исследования.

Глава «Обзор литературы» логично выстроена, написана хорошим языком и содержит основные современные данные по исследуемой проблематике. В первой части обзора дается определение протеинопатий как группы нейродегенеративных заболеваний, а также описание клинической картины бокового амиотрофического склероза и фронто-темпоральной деменции. Автор приводит подробное описание всех известных на сегодняшний день гипотез о возникновении и развитии патологического процесса в клетках нервной системы. Далее в обзоре описываются известные на данный момент генетические аспекты развития БАС и ФТД, показывающие, что в основе данных протеинопатий лежит нарушение одинаковых групп белков. Завершает обзор литературы описание созданных на сегодняшний день модельных организмов, воспроизводящих фенотипы БАС и ФТД.

Подробный анализ опубликованных на сегодняшний день данных от ведущих отечественных и зарубежных лабораторий позволил автору четко сформулировать и обосновать цели и задачи собственного диссертационного исследования.

В главе «Материалы и методы исследования» представлено исчерпывающее описание использованных экспериментальных методов. Обосновано использование методов для изучения поведения животных и уровня экспрессии исследуемых генов. Подробно и ясно описана проведенная в исследовании схема эксперимента. В конце главы охарактеризованы методы статистической обработки результатов.

В главе «Результаты и обсуждение» подробно изложены полученные результаты собственных экспериментов Е.А. Лысиковой. Описан процесс, путем которого животные линии L-FUS[1-359] были получены из

оригинальной линии трансгенных мышей tg_hFUS[1-359], а также дана развернутая характеристика полученной линии животных. Приведены данные тестирования локомоторной функции и продолжительности жизни животных линии L-FUS[1-359] в сравнении с tg_hFUS[1-359]. Представлены данные сравнительного анализа двух линий трансгенных животных по числу копий трансгенной кассеты и уровню ее экспрессии, а также данные качественного анализа на содержание патогенной формы белка в тканях спинного мозга трансгенных животных. Описаны результаты гистологического анализа белка в нейронах спинного мозга трансгенных животных. Во втором разделе представлены результаты поведенческого тестирования трансгенных и контрольных животных, которые подробно описывают поведенческий фенотип фронто-темпоральной деменции, выявленный у животных L-FUS[1-359]. Результаты анализа места встраивания трансгенной кассеты выявили транслокацию трансгена с 12 хромосомы у мышей оригинальной линии tg_hFUS[1-359] на соседнюю 11 хромосому у мышей L-FUS[1-359]. В следующем разделе главы представлены данные анализа транскриптомов спинного мозга животных L-FUS[1-359] методом секвенирования РНК. Автором представлено подробное описание различных групп генов, различающихся по показателям повышения или снижения уровня экспрессии. Данные биоинформационного анализа, путем которого были выявлены данные группы генов, были подтверждены методом ОТ-ПЦР для генов с повышенной, не измененной и сниженной экспрессией, которые подтвердили результаты секвенирования РНК. Эти данные представляются весьма перспективными в плане дальнейших исследований с целью определения молекулярных мишеней при разработке терапии FUS-протеинопатий.

На основании анализа всего комплекса данных, полученных в результате проведенной работы, автором сделаны обоснованные выводы, которые полностью соответствуют поставленным задачам.

Принципиальных замечаний нет, отмечаются стилистические погрешности, отдельные помарки. Все же хотелось получить ответы на следующие вопросы:

1. Получены мутантные мыши, у которых произошло инвертирование характерного для оригинальной линии tg_hFUS[1-359] фенотипа БАС на фенотип ФТД. Это случайный процесс или особенности используемого метода получения трансгенных мышей?
2. В какой мере проведенный анализ транскриптомы подтверждает выявленные когнитивные нарушения, иммуноцитохимические исследования?

ЗАКЛЮЧЕНИЕ.

Работа Лысиковой Е.А. «Новая модель фронто-темпоральной деменции на трансгенных мышцах с медленно прогрессирующей FUS-протеинопатией» отражает актуальную проблему современной науки в создании трансгенных животных, моделирующих развитие нейродегенеративных заболеваний, в основе развития которых лежит патологическая агрегация белка FUS. Диссертация Лысиковой Е.А. является законченной научно-квалификационной работой, содержащей новое решение актуальной научной задачи – создание трансгенной модели фронто-темпоральной деменции на основе линии мышей с нейроспецифической экспрессией патогенной формы белка FUS человека и определение групп генов, вовлеченных в подавление нейродегенеративного процесса в двигательных нейронах при низкой экспрессии патогенного белка FUS.

Диссертация соответствует требованиям, предъявляемым п. 9 «Положения о присуждении учёных степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г. в редакции постановления Правительства РФ от 28.08.2017г. №1024, а её автор, Лысикова Е.А., заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальностям 14.03.03 – патологическая физиология и 03.01.04 – биохимия.

Официальный оппонент:
доктор медицинских наук, профессор
г.н.с. лаборатории нейробиологии и
основ развития мозга
ФГАУ «НМИЦ здоровья детей»
Минздрава России

В.Г. Пинелис

Подпись д.м.н. В.Г. Пинелиса удостоверяю
Ученый секретарь ФГАУ «НМИЦ здоровья детей»
Минздрава России
кандидат медицинских наук



А.Г. Тимофеева

ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России
119991, Москва, Ломоносовский проспект, 2, стр.1
тел. +7499-134-30-83

Официальный сайт: <http://nczd.ru>, адрес электронной почты:
director@nczd.ru

19.02.2020