


«УТВЕРЖДАЮ»

Проректор ФГБОУ ВО
«Московский
государственный университет
имени
М. В. Ломоносова» – начальник
Управления научной политики
и организации научных исследований
д. ф-м. н., профессор РАН

А. А. Федянин
2020 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

о научно-практической значимости диссертации Лысиковой Екатерины Андреевны «Новая модель фронто-темпоральной деменции на трансгенных мышах с медленно прогрессирующей FUS-протеинопатией», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 14.03.03 – патологическая физиология и 03.01.04 – биохимия.

Актуальность темы научного исследования.

Нейродегенеративные заболевания являются распространенной группой болезней, имеющих, преимущественно, мультифакторную природу возникновения и характеризующиеся прогрессирующей гибелью нейронов спинного или головного мозга. Многие нейродегенеративные заболевания, обозначаемые термином протеинопатия, развиваются вследствие накопления в нейронах или клетках глии конформационно измененных белков, образующих крупные агрегаты. Утрата функции данных белков и образование токсичных для клетки белковых агрегатов приводит к

нарушению клеточной физиологии и дальнейшей гибели клетки. В патогенезе бокового амиотрофического склероза (БАС) и фронто-темпоральной деменции (ФТД) важная роль принадлежит протеинопатиям ряда белков. Заболеваемость БАС достаточно высока и составляет от 2 до 3 случаев на 100 000 человек. ФТД является второй по распространённости в мире деменцией пресенильного возраста после болезни Альцгеймера и регистрируется в различных популяциях от 3 до 15 случаев на 100 000 человек населения. БАС рассматривается как заболевание двигательной системы из-за поражения двигательных нейронов спинного мозга и двигательной коры головного мозга. ФТД характеризуется дегенерацией нейронов во фронтальной и височной коре больших полушарий головного мозга, что приводит к нарушению когнитивных функций и поведения. Данные молекулярно-генетических исследований послужили основой общепринятой в настоящее время гипотезы, согласно которой БАС и ФТД имеют общие механизмы патогенеза с различной локализацией патологического процесса, которая определяет клиническую картину заболевания. В основе целого ряда форм протеинопатий в нейронах спинного и головного мозга обнаруживаются агрегаты, сформированные РНК-связывающими белками, в том числе FUS. На сегодняшний день не создано эффективной терапии ни для БАС, ни для ФТД. Крайне лимитирован и набор животных моделей ФТД, вызванных патологической агрегацией белка FUS, поэтому актуальной задачей в исследованиях патогенеза и разработки методов лечения ФТД, остается разработка адекватных модельных систем, воспроизводящих основные звенья патогенеза.

Диссертация Е.А. Лысиковой посвящена важной задаче - разработке и созданию трансгенной модели ФТД на основе линии мышей с нейроспецифической экспрессией патогенной формы белка FUS человека. Научной новизной работы является использование новой линии для определения групп белков с измененной экспрессией, что делает возможным дальнейшее исследование механизмов подавления нейродегенеративного

процесса в двигательных нейронах при эктопической экспрессии патогенной формы белка FUS человека.

Связь выполненной работы с планами соответствующих отраслевых наук.

Диссертация Лысиковой Е.А. «Новая модель фронто-темпоральной деменции на трансгенных мышах с медленно прогрессирующей FUS-протеинопатией» выполнена в соответствии с тематикой и планом научной деятельности Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт физиологически активных веществ» Российской академии наук и Федерального государственного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии». Методология и результаты диссертации соответствует специальностям 14.03.03 – патологическая физиология и 03.01.04 – биохимия.

Научная новизна исследования и полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.

В работе впервые изучена линия трансгенных животных L-FUS[1-359], в геноме которых в экспериментальных условиях произошло инвертирование фенотипа с БАС, характерного для оригинальной линии tg_hFUS[1-359], на фенотип ФТД в линии L-FUS[1-359]. Показано, что у животных линии L-FUS[1-359] по сравнению с оригинальной линией снижен уровень экспрессии трансгенной кассеты при неизменном количестве копий трансгена. В работе Е.А. Лысиковой впервые проведено исследование патологической агрегации белка FUS в клетках нервной системы у мышей L-FUS[1-359] и выявлено диффузное распределение небольших агрегатов в цитоплазме нейронов, тогда как для животных оригинальной линии и пациентов с БАС и ФТД характерно образование крупных белковых агрегатов. Характер образования диффузных белковых агрегатов и отсутствие фенотипа БАС у трансгенных животных L-FUS[1-359] позволило

выдвинуть гипотезу о том, что при снижении экспрессии патогенной формы белка FUS человека в клетках нервной системы L-FUS[1-359] эффективность собственных защитных систем в двигательных нейронах достаточна для блокирования в них механизмов развития нейродегенеративного процесса.

Для определения возможных механизмов подавления развития патологического процесса у животных L-FUS[1-359] при агрегации РНК-связывающего белка FUS был проведен анализ транскриптомов спинного мозга, выявивший группы генов с измененной экспрессией. Дальнейшее изучение кодируемых данными генами белков позволит установить новые молекулярные мишени для разработки патогенетической терапии БАС и ФТД.

Обоснованность использованных методов, а также полученных результатов и положений диссертации.

Полученный в ходе исследования материал отвечает поставленной цели и задачам исследования, а также подтверждает положения диссертации, выносимые на защиту.

В соответствии с поставленной целью и задачами исследования проведена характеристика линии трансгенных животных L-FUS[1-359] с низким уровнем экспрессии трансгенной кассеты, кодирующей аберрантную форму белка FUS человека, с помощью комплекса молекулярно-генетических методов (ПЦР, ОТ-ПЦР, иммуноблоттинг, секвенирование РНК) и гистологических методов (иммуногистохимия, окрашивание по методу Ниссля). Для исследования развития фенотипа ФТД и оценки когнитивных функций трансгенных животных L-FUS[1-359] применялись методы поведенческого тестирования (открытое поле, тёмно-светлая камера, приподнятый О-лабиринт, индуцированный груминг, моделирование страха, резидент-интродер).

Выбор автором темы работы, её цели и задачи, а также методы исследования и формулировка основных положений обоснованы

результатами анализа данных современных зарубежных и отечественных литературных источников, степенью разработанности проблемы, достоинств и недостатков последних достижений в изучении механизма патогенеза БАС и ФТД и разработке терапии данных заболеваний.

В работе использованы современные методы статистической обработки данных и биоинформатического анализа. Анализ результатов данного исследования позволяет считать полученные экспериментальные данные достоверными. Результаты работы неоднократно представлялись на российских и международных конференциях.

Экспериментальные данные работы Е.А.Лысиковой являются новыми и достоверными, представлены в достаточном количестве в виде иллюстраций и таблиц, что позволяет объективно оценить результаты исследования.

Научная и практическая значимость полученных автором диссертации результатов.

Создание линии трансгенных животных L-FUS[1-359], воспроизводящих фенотип фронто-темпоральной деменции, представляет высокую научную значимость, поскольку все имеющиеся на сегодняшний день животные модели FUS-протеинопатии не воспроизводят фенотип ФТД без развития моторной дисфункции.

Использование трансгенных животных с экспрессией укороченной формы белка FUS, обладающей исключительно высокой склонностью к агрегации, является перспективным для изучения патогенетических механизмов развития таких протеинопатий, как БАС и ФТД. Белок FUS относится к семейству РНК-связывающих белков и участвует в процессах транскрипции и трансляции, транспорте РНК из ядра в цитоплазму и других физиологически важных клеточных процессах. Поэтому, согласно различным исследованиям, агрегация белка FUS занимает центральное место в развитии патологического процесса, приводящего к гибели клетки.

Поскольку животные линии L-FUS[1-359] имеют низкий уровень экспрессии трансгенной кассеты, кодирующей патогенную форму белка FUS человека, и вместо классических крупных белковых агрегатов в ядре и цитоплазме образуют диффузно распределенные небольшие агрегаты, что не сопровождается развитием нейродегенеративного процесса в двигательных нейронах, то данная линия животных может использоваться для анализа собственных клеточных защитных механизмов в этих нейронах. Определение молекулярных каскадов, которые активируются или ингибируются нейроном для подавления патогенного действия аберрантной формы белка FUS может служить основой для разработки патогенетической терапии БАС.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы.

Фактические данные и теоретические положения диссертации Е.А. Лысиковой могут использоваться в работе научно-исследовательских коллективов, занимающихся проблемами патогенеза протеинопатий и молекулярно-биохимическими каскадами для определения терапевтических мишеней.

Личный вклад автора.

Разработка основной научной идеи и планирование диссертационного исследования выполнено при непосредственном активном участии автора. Все ключевые эксперименты выполнены автором лично. Часть вошедших в диссертационную работу данных получена в соавторстве с другими исследователями при участии автора. Автором самостоятельно проведён анализ результатов, выполнена их статистическая обработка и интерпретация. Выводы на основе полученных результатов сформулированы автором самостоятельно. Основные публикации написаны автором самостоятельно по результатам выполненной работы.

Оценка содержания работы.

Диссертация построена по традиционному плану, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов, списка условных сокращений и списка использованной литературы, содержащего 253 источника, из которых 16 российские и 237 зарубежные. Работа изложена на 136 страницах машинописного текста, иллюстрирована 25 рисунками и содержит 2 таблицы.

Диссертация написана грамматически и стилистически правильно, изложена научным языком, представлена целостно и логично, имеет научную новизну и практическую значимость. Главы диссертации логически выверены, проиллюстрированы достаточным количеством рисунков, выводы соответствуют поставленной цели и задачам исследования.

По материалам диссертации Е.А. Лысиковой опубликовано 15 печатных работ, в том числе 3 статьи в рецензируемых журналах из перечня рецензируемых научных изданий ВАК РФ и 12 тезисов в сборниках докладов российских и зарубежных научных конференций.

Замечания и вопросы по диссертационной работе.

Принципиальных замечаний при анализе диссертации Е.А. Лысиковой не возникло. Вместе с тем, при чтении диссертации возникает несколько дискуссионных моментов.

1. Автор провёл валидацию результатов РНК-секвенирования для нескольких мРНК. Было бы интересно проверить, сохраняются ли обнаруженные изменения экспрессии на уровне продукции кодируемых белков.

2. Было бы интересно изучить когнитивные функции и способность к обучению трансгенных мышей в возрасте 2х лет и сравнить эти данные, с данными, приведенными в диссертации для мышей других возрастных групп.

Текст автореферата соответствует содержанию диссертации. Тема исследования соответствует специальностям 14.03.03 – патологическая физиология и 03.01.04 – биохимия.

Заключение.

Диссертация Е.А. Лысиковой «Новая модель фронто-темпоральной деменции на трансгенных мышах с медленно прогрессирующей FUS-протеинопатией» на соискание степени кандидата биологических наук является законченным научно-квалификационным трудом, содержащим новое решение актуальной проблемы патофизиологии – создание модели трансгенных животных, моделирующих фронто-темпоральную деменцию, в основе развития которой лежит патологическая агрегация белка FUS. Результаты работы имеют практическое значение для изучения патогенеза ФТД и для дальнейшего исследования молекулярных каскадов для определения мишеней при разработке терапии.

Диссертация соответствует требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 824 от 24 сентября 2013 года (в редакции Постановления Правительства Российской Федерации № 1024 от 28 августа 2017 г.), а ее автор, Екатерина Андреевна Лысикова, заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальностям 14.03.03 – патологическая физиология и 03.01.04 – биохимия.

Отзыв на диссертацию подготовлен директором Института перспективных исследований мозга МГУ имени М. В. Ломоносова, доктором медицинских наук, академиком РАН Анохиным Константином Владимировичем, обсужден и утвержден на заседании Экспертного совета

Института перспективных исследований мозга МГУ имени М. В. Ломоносова 03 февраля 2020 г., протокол № 2 и направляется в Диссертационный совет Д при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» (125315, г. Москва, ул. Балтийская, 8).

**Доктор медицинских наук, профессор,
директор Института перспективных исследований
мозга МГУ имени М. В. Ломоносова,
академик РАН**

Анохин Константин Владимирович



Анохин

**Заместитель директора Института
перспективных исследований мозга
МГУ имени М.В.Ломоносова**

Егикова

Егикова Виола Михайловна

Институт перспективных исследований мозга МГУ имени М. В. Ломоносова
Адрес: 119991, Москва Ленинские горы, д.1
Телефон: 8(495) 938-25-48
Электронная почта: contact@brain.msu.ru