

## **ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА**

доктора биологических наук, член-корреспондента РАН, профессора, руководителя отдела химии лекарственных средств Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова» Гудашевой Татьяны Александровны на диссертацию Устюгова Алексея Анатольевича «Стратегия поиска препаратов для лечения нейродегенеративных заболеваний на основе трансгенных клеточных и животных моделей протеинопатий», представленную на соискание учёной степени доктора биологических наук по специальности 14.03.03 – патологическая физиология.

### **Актуальность темы выполненной работы.**

По данным Института мозга человека им. Н.П. Бехтеревой распространённость нейродегенеративных заболеваний в России к 2030 году возрастёт более чем в 1,5 раза и к 2050 году превысит эпидемиологический порог в 5% населения страны. Существующие препараты для лечения этих заболеваний являются симптоматическими. Разработку подобных препаратов осложняет то, что с патофизиологической точки зрения нейродегенеративные заболевания представляют собой этиологически неоднородную группу, в связи с чем использование традиционных подходов для поиска таких препаратов малоэффективно. Для воспроизведения ключевых звеньев патогенеза нейропатологии необходимо использование адекватных животных моделей.

В связи с этим диссертационная работа Устюгова А.А. «Стратегия поиска препаратов для лечения нейродегенеративных заболеваний на основе трансгенных клеточных и животных моделей протеинопатий» является актуальной. Разработанные Устюговым А.А. клеточные и животные модели позволяют изучать молекулярные механизмы протеинопатий, вовлечённых в патогенез нейродегенеративных заболеваний, а также проводить поиск соответствующих потенциальных лекарственных препаратов. Поэтому эта работа вносит значительный вклад в фундаментальную и практическую неврологию.

### **Научная новизна, теоретическая и практическая значимость исследования.**

Наиболее ценным инновационным достижением исследования является разработка линий трансгенных животных моделей различных аспектов патологических состояний при нейродегенеративных заболеваниях. Создана линия мышей, у которых можно прижизненно регулировать экспрессию альфа-синуклеина. Эта модель даёт максимальное с молекулярной точки зрения приближение к состоянию истощения пула функционального альфа-синуклеина, близкое к картине, наблюдаемой у пациентов с паркинсоническим синдромом. Другой созданной моделью является трансгенная модель FUS-протеинопатии, при которой наблюдается накопление укороченной изоформы белка FUS человека в виде множественных

внутриклеточных отложений, в результате чего у мышей появляется характерный тремор, парезы и параличи, схожие с наблюдаемыми у пациентов с боковым амиотрофическим склерозом. Впервые была продемонстрирована взаимосвязь накопления FUS-положительных агрегатов в спинном мозге мышей и появлением симптоматических признаков болезней двигательного нерва.

Полученные линии мышей являются уникальными для исследования фундаментальных механизмов, лежащих в основе нейродегенеративных заболеваний.

С использованием разработанных трансгенных мышечных моделей в качестве тест-систем получены новые данные о нейропротекторных свойствах отечественного препарата Димебона и его фторированных производных, два из которых успешно прошли доклинические испытания как потенциальные препараты для лечения протеинопатий.

Таким образом, использование трансгенных клеточных и животных моделей протеинопатий при поиске новых препаратов для лечения нейродегенеративных заболеваний является ключевым и чрезвычайно значимым элементом при разработке и поиске инновационных препаратов.

#### **Степень достоверности результатов проведённого исследования и их апробация.**

Цель исследования заключалась в создании моделей протеинопатий для изучения патологических свойств белков, вовлечённых в патогенез нейродегенеративных процессов, а также в поиске новых подходов, направленных на коррекцию нейродегенеративных заболеваний в модельных системах. Сформулированные в диссертации задачи исследования, а также используемые схемы экспериментов и применяемые методы полностью соответствуют цели диссертации, корректны и достаточны для её достижения.

В диссертационной работе представлены результаты исследований по моделированию протеинопатий в клеточных культурах, разработаны методы визуализации клеточных отложений, описаны методы по анализу перераспределения агрегированных форм белков, получены уникальные трансгенные линии животных с возможностью прижизненной регуляции экспрессии гена альфа-синуклеина, а также трансгенная животная модель с эктопной экспрессией укороченной формы белка FUS человека. Дана подробная фенотипическая характеристика этих линий, включающая анализ локомоторных и когнитивных функций. Дан подробный биохимический, иммуногистохимический и генетический анализ трансгенных моделей для поиска и оценки эффективности новых препаратов. Все это позволяет рассматривать диссертацию как всеобъемлющий труд, включающий в себя широкомасштабный экспериментальный материал.



Описание использованных методов логично поделено на разделы, которые включают в себя: (1) описание линий трансгенных животных, в котором приведены все ключевые эксперименты по характеристике линий; (2) раздел с подробным описанием методик генотипирования всех используемых в исследовании линий животных; (3) раздел, посвящённый описанию методов анализа белков, включая иммуноблоттинг; (4) обширная часть посвящена развёрнутому гистологическому анализу тканей с подробным описанием методов окраски материалов, в том числе иммуногистохимическими методами; (5) блок с описанием методов поведенческого тестирования; (6) анализ транскриптомов и секвенирования РНК; (7) раздел с описанием методов ведения культур клеток, а также главы по введению тестируемых соединений и статистической обработке данных.

Оценка агрегационных свойств новых белков была проведена двумя независимыми методами: с использованием лазерной конфокальной микроскопии и биохимическими методами с использованием дифференциального центрифугирования и последующего иммуноблоттинга. Подробно описаны методики по получению трансгенных линий животных с возможностью прижизненной инактивации гена альфа-синуклеина. Разработанные методы по скрещиванию животных и генетическому анализу полученных когорт также подробно иллюстрированы в работе. Отдельное внимание при разработке линии мышей с инактивацией гена альфа-синуклеина уделено характеристике и гистологическому анализу отделов ЦНС, в которых происходят наиболее значимые изменения при паркинсоническом синдроме: чёрной субстанции и вентральной области покрышки. Проведён сравнительный морфометрический анализ дофаминергических нейронов в чёрной субстанции мозга и вентральной области покрышки мышей при генетической инактивации альфа-синуклеина. Отсутствие альфа-синуклеина было подтверждено как на генетическом уровне с помощью анализа экспрессии гена, так и биохимическим методом иммуноблоттинга образцов тканей мозга и при помощи иммуногистохимического анализа срезов мозга. Подобные методики были также использованы для характеристики другой модели – FUS-протеинопатии. При этом животным была введена экспрессирующая кассета с aberrантной формой белка FUS, встречающейся в составе внутриклеточных отложений в аутопсийном материале у пациентов с БАС. У полученной трансгенной линии мышей проведено подробное исследование накоплений в разных отделах ЦНС. Методом иммуноблоттинга было показано накопление трансгенной изоформы белка FUS человека в нервных тканях мышей. Иммуногистохимический анализ также показал наличие включений в спинном мозге трансгенных животных.

Поведенческое фенотипирование включало в себя батарею тестов по исследованию когнитивных и моторных функций с использованием классических тестов по удержанию на сетке, вращающемся стержне, «открытое поле» и различных лабиринтов, а также более экзотических и уникальных тестов по анализу походки на установке Noldus CatWalk и тестов по анализу «груминга», «моделированию страха» и «резидент-интродер». Методики тестирования подробно описаны. Стоит также отдельно отметить использование современных методов анализа экспрессии генов методом секвенирования РНК при характеристике линии FUS(1-359), которое также включало в себя анализ обработанных данных с использованием параметрических и непараметрических методов статистического анализа.

Таким образом, разнообразие использованных методов позволяет сделать заключение, что методологический уровень диссертационной работы Устюгова А.А. соответствует мировым стандартам.

Основные результаты исследования отражены в 46 (16 в журналах Q1/Q2) научных публикациях на русском и английском языках, 31 из которых опубликованы в изданиях, рекомендованных ВАК РФ, доложены на 20 региональных и международных профильных научных конференциях.

### **Структура диссертации и качество оформления**

Диссертационная работа Устюгова А.А. построена по общепринятому принципу и изложена на 290 страницах печатного текста. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, пяти разделов собственных исследований с обсуждением результатов, а также заключения, выводов и списка литературы. Текст диссертации изложен толковым научным языком и снабжён обширным иллюстративным материалом, включающим 89 рисунков и шесть таблиц. Библиографический указатель состоит из 613 источников, 575 из которых на английском языке. Наиболее значимые результаты исследований представлены в семи развёрнутых выводах, обоснованы экспериментально и соответствуют задачам и цели исследования. Содержание реферата отражает основные положения диссертации. Имеются все основания признать работу завершённой. Замечаний к работе нет. Однако, при ознакомлении с работой возникают вопросы:

1. Хорошо известно, что эффективность нейропротекторного препарата связана с активацией эндогенных систем защиты клетки от гибели. По какому механизму может происходить такая активация в случае препарата Димебон и его производных?



2. Поскольку нейродегенеративные заболевания имеют множественную патогенную природу, в последнее время появилось направление по созданию препаратов с мультитаргетным действием. По вашему мнению, препарат Димебон и его аналоги, которые вы изучали, можно ли отнести к такому классу? Если да, то какие возможные механизмы их действия вами были изучены? На какие рецепторы или на какие сайты конкретных рецепторов они действуют?

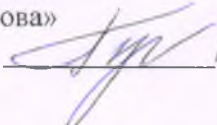
3. Какие патологические признаки, выявленные Вами у трансгенных животных с моделью БАС, сопоставимы с клиническими проявлениями у пациентов? Другими словами, насколько эта модель релевантна?

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По актуальности выбранной темы, объёму и методологическому уровню проведённых исследований, научной и практической значимости полученных результатов диссертационная работа Устюгова Алексея Анатольевича, представленная на соискание степени доктора биологических наук по специальности 14.03.03 – патологическая физиология, биологические науки, соответствует требованиям п.9 Положения «О порядке присуждения учёных степеней», утверждённого Постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24 сентября 2013 г. (в редакции Постановления Правительства Российской Федерации №335 от 21 апреля 2016 г.), а её автор заслуживает присуждения искомой степени доктора биологических наук по специальности 14.03.03 – патологическая физиология.

Официальный оппонент:

доктор биологических наук, член-корр. РАН  
руководитель отдела химии лекарственных средств  
Федерального государственного бюджетного  
научного учреждения «Научно-исследовательский  
институт фармакологии имени В.В. Закусова»  
01.02.2021

 / Гудашева Т.А.

Подпись член-корр. РАН, профессора, Гудашевой Т.А. заверяю,  
Учёный секретарь ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова»

Кандидат биологических наук  / Крайнева В.А.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова»  
125315, г. Москва, ул. Балтийская, д. 8  
тел. +7 (499) 151 18 81, Официальный сайт: <https://www.academpharm.ru/>, адрес электронной почты: [zakusovpharm@mail.ru](mailto:zakusovpharm@mail.ru)