

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора медицинских наук Мухамедьярова Марата Александровича 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 исследования

Диссертационная работа Устюгова А.А. «Стратегия поиска препаратов для лечения нейродегенеративных заболеваний на основе трансгенных клеточных и животных моделей протеинопатий» посвящена актуальной проблеме современной медицины и биологии - разработке адекватных моделей нейродегенеративных заболеваний на лабораторных животных и применению этих моделей при разработке инновационных методов лечения данных патологий.

К нейродегенеративным заболеваниям относятся болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, боковой амиотрофический склероз и другие заболевания, от которых страдают десятки миллионов людей по всему миру. Несмотря на очевидный прогресс в изучении данных заболеваний, они до сих пор остаются неизлечимыми. Имеющиеся на сегодняшний день лекарственные средства позволяют замедлить, но не способны остановить развитие данных заболеваний. Использование трансгенных линий мышей является одним из наиболее адекватных подходов для моделирования заболеваний человека. Применение генетических подходов в работе А.А. Устюгова позволило осуществить моделирование специфических молекулярно-клеточных нарушений, воспроизводящих основные патологические признаки нейродегенеративных процессов. Использование таких моделей позволяет изучать механизмы нейродегенерации (в том числе – на досимптомной стадии патологии) и вести разработку методов лечения. Таким образом, диссертационное исследование А.А. Устюгова, посвящённое созданию и изучению новых моделей нейродегенеративных заболеваний и поиску препаратов для их лечения, является актуальным и своевременным.

Научная новизна, теоретическая и практическая значимость исследования

Автором был создан ряд уникальных клеточных и животных трансгенных моделей, где нарушение естественной локализации белков приводило к появлению патологических признаков как на молекулярном, так и на фенотипическом уровнях,

воспроизводящих ключевые патологические аспекты нескольких нейродегенеративных заболеваний. Впервые была создана *in vivo* модель с возможностью прижизненной инактивации гена альфа-синуклеина, что позволяет изучать роль данного белка в качестве потенциальной терапевтической мишени. Была создана модель бокового амиотрофического склероза в трансгенной линии мышей с эктопной экспрессией укороченной формы белка FUS человека. Проведено тестирование перспективных соединений из ряда гамма-карболинов и их фторированных производных, которое показало эффективность терапии в ряде функциональных тестов на двигательную активность. Помимо теоретической, работа имеет большую практическую значимость - разработанные в исследовании экспериментальные линии животных и клеточные модели протеинопатии могут быть использованы и применены для изучения эффективности нейропротекторных препаратов.

Общая характеристика работы

Диссертационная работа Устюгова Алексея Анатольевича построена по традиционной схеме и состоит из введения, обзора литературы, глав материалов и методов, результатов собственных исследований, обсуждения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 290 страницах машинописного текста и включает ссылки на 613 литературных источников, в том числе более 30 отечественных. Работа хорошо иллюстрирована 89 рисунками и шестью таблицами, тем самым облегчает восприятие изложенного материала. Диссертация оформлена с требованиями ВАК, а её содержание соответствует специальности 14.03.03 – патологическая физиология.

Во «Введении» автор чётко обосновывает актуальность работы. Цель и задачи, данные о научной новизне, теоретической и практической значимости, личном вкладе автора сформулированы грамотно и лаконично. Открывает основную часть работы «Обзор литературы», где широко представлен анализ отечественной и зарубежной литературы по теме диссертационной работы. Обзор написан чётко, хорошим литературным языком и развёрнут в пяти разделах. Первый раздел посвящён этиологии и современному представлению нейропатологий, с основным упором на классификацию болезней с точки зрения молекулярных механизмов, которые задействованы при нейродегенеративных заболеваниях. В последующих четырёх разделах рассматриваются основные молекулярные мишени для фармакологического воздействия при лечении нейропатологий, а также патологической роли агрегации белков (протеинопатии) и использованию трансгенных животных для моделирования

протеинопатий и поиску новых препаратов. Обзор иллюстрирует представление о состоянии текущей проблемы в данной области, имеет много ссылок на литературу за последние несколько лет, а также на основные работы по тематике исследования. Такой подход к освещению темы наглядно свидетельствует о том, что автор ориентируется в современной литературе. Необходимо также отметить, что обзор достаточно чётко сфокусирован и не создаёт ощущения перегруженности работы и занимает примерно четверть от общего объёма диссертации. К недостатку обзора литературы стоит отнести тот факт, что раздел обзора «Поиск лекарственных препаратов для лечения нейродегенеративных заболеваний» посвящен болезни Альцгеймера, тогда как в диссертационном исследовании автор разрабатывал модели и способы лечения других нейродегенеративных заболеваний.

Во второй главе описаны различные методы генотипирования трансгенных животных, представлены и детально описаны методы для биохимического, иммуногистохимического и иммунофлуоресцентного анализа препаратов тканей из различных отделов нервной системы животных. Детально описаны функциональные методы исследования, включающие поведенческие тесты по анализу двигательных и когнитивных функций животных. Автором также в работах применялись культуры клеток, включая получение гиппокампальной культуры из трансгенных животных и использование перевиваемой культуры нейробластомы человека. Стоит отметить, что в работе также использовались методы по анализу транскриптомов и секвенированию РНК, полученной из тканей трансгенных животных, что, несомненно, говорит об использовании автором современных методов.

Третья глава посвящена описанию и обсуждению собственных результатов исследования. Открывают раздел результаты клеточных исследований по моделированию протеинопатий и разработках клеточных моделей. Последующие разделы сосредоточены на изучении патологических аспектов и моделировании протеинопатий на трансгенных животных. Разделы описывают роль различных белков в патогенезе нейропатологий, включающих альфа-синуклеин и белок FUS. Отдельное направление представляет изучение эффективности соединений из ряда гамма-карболинов, в частности, препарата Димебон и его фторированных производных. Их свойства были изучены как на клеточных, так и на трансгенных животных моделях. Заключительные разделы представлены заключением и выводами, где на основании экспериментальных данных сформулировано семь выводов, которые отражают результаты исследований, обоснованы и соответствуют целям и задачам.

Степень обоснованности положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Автором выполнено обширное научное исследование по разработке генетических моделей нейродегенеративных заболеваний, изучению патологических процессов белковой агрегации как на клеточном уровне, так и в трансгенных животных моделях. Установлено, что применение препарата Димебон в моделях болезни Паркинсона и бокового амиотрофического склероза оказывает положительные терапевтические эффекты, исследованы механизмы развития данных эффектов. Устюгов А.А. использовал современные экспериментальные и статистические методы, выполнен большой экспериментальный объем научной работы, что свидетельствуют о высокой степени обоснованности всех положений и выводов диссертационного исследования. Используемые автором методы исследований имеют комплексный характер и соответствуют поставленным целям и задачам исследовательской работы. Целостность работы определена совокупностью результатов и выводов, которые определяют завершенность проведенного диссертационного исследования.

По материалам диссертационной работы опубликовано 46 научных статей в ведущих отечественных и зарубежных научных журналах (31 статья в изданиях, рекомендованных ВАК РФ), при этом большинство статей опубликовано в журналах, индексируемых в Scopus и/или Web of Science. Результаты работы доложены и обсуждены на многочисленных профильных отечественных и международных конференциях и симпозиумах. Результаты работы легли в основу одного патента, где Устюгов А.А. является соавтором. Автореферат отражает основные положения диссертации.

Вопросы и замечания

В процессе изучения работы возникло несколько замечаний и вопросов:

1. Положения, выносимые на защиту, по своей формулировке в большей степени похожи на выводы работы, чем на положения.
2. В обзоре литературы представлены данные о поиске лекарственных препаратов для лечения болезни Альцгеймера, что не полностью релевантно самому диссертационному исследованию, поскольку оно посвящено моделированию и поиску лекарственных препаратов для лечения других нейродегенеративных заболеваний.

3. В результатах исследования имеется раздел 3.3.1 «Репозиционирование препарата Димебон в качестве нейропротектора», по своему содержанию более соответствующий главе «Обзор литературы»,

4. Автор в своем диссертационном исследовании рассматривает нейродегенеративные заболевания в качестве протеинопатий, то есть патологий, связанных с нарушением метаболизма определенного белка (белков). Вместе с тем, существуют и другие теории этиопатогенеза нейродегенеративных заболеваний, в которых ключевая роль в развитии той или иной патологии отводится метаболизму липидов, патологии синапсов, воспалению и др. Существует ли в этом противоречие, и как наличие других теорий этиопатогенеза нейродегенеративных заболеваний влияет на интерпретацию полученных в диссертации результатов?

5. Разработанные автором трансгенные линии животных, очевидно, в большей степени моделируют генетические формы нейродегенеративных заболеваний, тогда как наиболее распространенными являются спорадические формы данных недугов. Насколько адекватными можно считать разработанные автором трансгенные линии мышей для моделирования спорадических форм нейродегенеративных заболеваний?

6. Известно, что одним из ключевых событий в патогенезе бокового амиотрофического склероза является дисфункция и деструкция нервно-мышечных синапсов, при этом гибель мотонейронов может быть вызвана патологическими процессами, происходящими в глиальных клетках и скелетных мышечных волокнах (Dupuis and Loeffler, 2009). Как результаты, полученные автором диссертации, согласуются с вышеуказанными данными? Имеются ли сведения о влиянии Димебона и фторированных гамма-карболинов на морфофункциональное состояние нервно-мышечных синапсов в норме и в модели бокового амиотрофического склероза?

Заключение. Диссертационная работа Устюгова А.А. «Стратегия поиска препаратов для лечения нейродегенеративных заболеваний на основе трансгенных клеточных и животных моделей протеинопатий», представленная к защите на соискание учёной степени доктора биологических наук по специальности 14.03.03 – патологическая физиология, является законченной научно-квалификационной работой, выполненной на высоком научном и методическом уровне. В исследовании автором решена важная научная проблема в области патологической физиологии, связанная с моделированием на животных процессов патологической агрегации белков как на

клеточном, так и на организменном уровне, приводящих к развитию нейродегенеративных заболеваний, а также с изучением эффективности Димебона и фторированных гамма-карболинов для коррекции нарушений в моделях нейродегенеративных заболеваний. Разработанные в диссертационном исследовании трансгенные модели нейродегенеративных заболеваний имеют важное научно-практическое значение, поскольку могут быть использованы для изучения молекулярных механизмов патогенеза нейродегенеративных заболеваний и разработки эффективных терапевтических подходов для данных патологий.

Представленная диссертация 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, Устюгов Алексей Анатольевич, заслуживает присуждения искомой степени доктора биологических наук по специальности 14.03.03 – патологическая физиология.

Официальный оппонент:

доктор медицинских наук, доцент,
профессор кафедры нормальной физиологии
федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего образования
«Казанский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

М.А. Мухамедьяров

03.02.2021



Подпись <u>Мухамедьяров М.А.</u>
_____ заверяю.
Учёный секретарь Учёного Совета ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России, д.м.н. _____ И.Г. Мустафин
« <u>03</u> » <u>02</u> 20 <u>21</u> г.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации
420012, Россия, Республика Татарстан, г. Казань, ул. Бутлерова, д. 49
8(843) 292 72 99, <https://kazan-gmu.ru>
электронная почта составителя отзыва: marat.muhamedyarov@kazan-gmu.ru