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 Пинелиса Всеволода Григорьевича 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

Диссертационная работа Устюгова А.А. «Стратегия поиска препаратов для лечения нейродегенеративных заболеваний на основе трансгенных клеточных и животных моделей протеинопатий» посвящена крайне актуальной проблеме изучения механизмов развития и поиска подходов к созданию средств лечения нейродегенеративных заболеваний. Острая востребованность работ в этой области подтверждена печальной общемировой и отечественной статистикой, отмечающей нарастающее число больных нейродегенеративными заболеваниями, что связано с увеличением средней продолжительности населения в развитых странах. При этом до настоящего времени остаются недостаточно изученными механизмы нейродегенерации и нейропротекции при этих состояниях, что наряду с отсутствием до последнего времени адекватных биологических систем, моделирующих такого рода патологии существенно сдерживает поиск эффективных способов их лечения. В этой связи исследование молекулярных механизмов нейродегенеративных заболеваний с помощью разработанных трансгенных клеточных и животных моделей, а также применением этих моделей для поиска новых препаратов, направленных на коррекцию нейропатологии представляется крайне актуальным. Прежде всего это касается патологий, связанных с прогрессирующей гибелью нервных клеток

при таких заболеваниях как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, боковой амиотрофический склероз и ряда других. Однако, несмотря на гетерогенность заболеваний этой группы, для них характерны некоторые общие механизмы, а именно, патологическая агрегация конформационно-изменённых и часто потенциально амилоидогенных белков, таких как тау, β-амилоидные пептиды, синуклеины, TDP-43, FUS и др., сопровождающаяся образованием характерных патогистологических включений. Несмотря на то, что каждое заболевание обусловлено нарушением метаболизма и агрегацией определенного белка или набора белков, а распределение белковых включений как внутри клетки, так и по отделам нервной системы значительно варьируется, схожий молекулярный механизм патогенеза позволил объединить подобные заболевания в группу т.н. протеинопатий. Для этой группы нейропатологий характерно изменение структуры, нарушение метаболизма и агрегация ряда белков, потеря их функции, сопровождаемая формированием специфических гистопатологических белковых включений в разных отделах нервной системы. Важным инструментом для исследования молекулярных изменений, ведущих к развитию протеинопатий, является их моделирование в *in vitro* и *in vivo* моделях с использованием клеточных линий и генетически модифицированных лабораторных животных.

Современные успехи генетики способствовали не только установлению точного места нарушения в структуре гена, выявлению экспрессии определенных белков, но и позволили изучать процесс патогенеза генетических заболеваний на созданных мутагенных линиях различных генетических заболеваний, объединенных в группу протеинопатий. Кроме того, появилась возможность коррекции выявленных изменений с помощью потенциальных лекарственных препаратов, действие которых направлено на блокаду развития патологической агрегации белков. К числу таких веществ принадлежит и препарат Димебон, проходивший клинические испытания на больных болезнью Альцгеймера и некоторые его производные в ряду гамма-карболинов.

Представленная к защите работа Устюгова А.А. посвящена изучению механизмов развития определенных типов протеинопатий на вновь созданных уникальных линиях трансгенных животных, которые могут воспроизводить ключевые звенья нейропатологии *in vivo*, а также быть использованы для отбора и изучения нейропротекторной эффективности терапевтических подходов, и в этой связи является своевременным и актуальным для современной фундаментальной патофизиологии и трансляционной медицины комплексным научным исследованием. Реализация задач, поставленных и решенных в данной работе позволит существенно оптимизировать разработку патогенетической терапии НДЗ.

Научно-практическая значимость работы определяется установлением следующих основных закономерностей:

1. Диссертантом разработана новая концепция моделирования протеинопатий основанная на изменении экспрессии таргетного гена, в частности, с использованием с использованием Cre-рекомбиназы, позволяющая проводить прижизненную инактивацию гена во встроенной в геном генетической конструкции. Такой подход был реализован впервые для моделирования потери функционального пула альфа-синуклеина.

2. Впервые использована укороченная модифицированная форма FUS человека, генетическая конструкция которого была сначала валидирована на клеточных линиях. Такой подход позволил отобрать наиболее адекватную мутантную форму FUS, которая затем была использована для получения трансгенной линии животных. Важно отметить, что для реализации специфической экспрессии мутантного FUS человека был выбран пан-нейрональный промотер, который обеспечил сценичность экспрессии трансгена в нейрональных тканях.

3. Разработаны и охарактеризованы линии трансгенных животных, которые использовались в качестве тест-систем для направленного поиска и отбора новых соединений, что позволило выявить новые препараты, способные

замедлять прогрессию протеинопатии и развитие нейродегенеративного процесса в нервной системе модельных животных.

4. На трансгенной животной модели FUS-протеинопатии, как удобной тест-системы для оценки эффективности препаратов с использованием батареи тестов двигательных дисфункций, в том числе, на высокотехнологичной установке по анализу походки «Noldus CatWalk» исследованы свойства перспективной группы соединений из серии фторированных производных гамма-карболинов.

5. Анализ результатов, полученных с помощью современного метода секвенирования РНК, позволил впервые определить группы генов с повышенной и пониженной экспрессией при некоторых протеинопатиях.

Высокий уровень практической значимости работы Устюгова подтверждается целым рядом полученных конкретных результатов, которые могут быть использованы для направленного поиска и отбора перспективных нейропротекторных соединений. В частности, в результате проведенной работы определены мишени для последующего скрининга лекарственных средств. На основе полученные трансгенных мышей созданы модельные системы для оценки эффективности потенциальных лекарственных препаратов. На основе анализа фенотипических и молекулярных показателей животных FUS-протеинопатией в работе получены новые данные по эффективности действия новой группы веществ из ряда фторированных производных гамма-карболина (биоизостерных аналогов отечественного препарата Димебон) в качестве оригинальных нейропротекторов и определены наиболее перспективные соединения.

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

Полученные результаты могут быть использованы как пример в профильных образовательных программах по патофизиологии и трансляционной медицине в ВУЗах.

Степень достоверности результатов проведённого 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 46-ти научных работах, опубликованных в журналах 1-го квартиля и РИНЦ, имеется одно Ноу-хау и 1 патент. Автореферат и опубликованные работы полностью отражают основные положения диссертации.

Структура диссертации и качество оформления. Диссертация Устюгова А. А. построена по традиционной схеме и состоит из введения и содержательной части, включающей обзор литературы, материалов и методов, описания собственных результатов и их обсуждения, заключения и списка литературы. Диссертация представлена на 290 страницах машинописного текста и содержит шесть таблиц и 89 рисунков. В список литературы включено 613 источников: 38 отечественных и 575 зарубежных работ. Работа оформлена в соответствии с требованиями ВАК по специальности 14.03.03 – патологическая физиология.

В первой главе – введении, обоснована актуальность исследования, чётко сформулирована цель, которая основывается на создание моделей протеинопатий и их характеристике, а также использовании моделей для поиска препаратов, и поставлены соответствующие заданной цели задачи. Представлена научная новизна и практическая значимость, сформулированы основные положения, выносимые на защиту.

Обзор литературы представлен на 69 машинописного текста и описывает современное представление о нейродегенеративных заболеваниях, показан обзор потенциальных мишеней, указывается роль протеинопатии в патогенезе нейродегенеративных заболеваний, а также рассмотрены ключевые подходы при поиске эффективных препаратов лечения. Приведённые данные позволяют

аргументированно подчеркнуть актуальность исследования и несомненную значимость выполнения.

Глава «Материалы и методы» занимает 25 страниц машинописного текста и разделена на 9 разделов с подробным описанием методов, которые соответствуют современному уровню науки. Выбор методик включает описание подходов получения трансгенных животных, генотипирования, биохимическому анализу белков, иммуногистохимическому анализу, методов клеточной биологии, а также используются современные подходы по анализу экспрессии генов путём секвенирования РНК. Отдельным разделом представлено описание используемых методов статистической обработки данных. Методы адекватно подобраны и позволяют решить автором поставленные задачи, что является ключевым с учётом широкого спектра модельных систем и различных экспериментальных методик, необходимых для достижения поставленной цели.

Результаты и обсуждение представлены отдельной главой и включают в себя четыре блока исследований. Первый раздел посвящён клеточным моделям протеинопатий, где речь идёт об использовании полученных различных векторов для изучения агрегационных свойств двух родственных белков TDP-43 и FUS. Однако не указано, почему были выбраны в дальнейшем только конструкты с FUS. В разделе детально изучены различные мутантные формы FUS и их локализация в клетке, что послужило отправной точкой в выборе необходимой трансгенной конструкции для создания мышиной линии.

Второй раздел главы сфокусирован на целой линейке разработанных трансгенных животных, моделирующих различные патологические аспекты нейродегенеративных процессов. Первым описана новые модель генетически-модифицированных мышей с нокаутом гена альфа-синуклеина. Если быть точным, то в ходе работы над созданием кондиционного нокаута альфа-синуклеина было создано по меньшей мере три независимых линии, которые отличались между собой на генетическом уровне, а результаты исследований этих линий легли в основу двух высокорейтинговых публикаций. Исключительной особенностью использования и разработки этих линий

являлось возможность прижизненной регуляции экспрессии гена альфа-синуклеина с использованием Cre-рекомбиназы и обработки животных тамоксифеном. В результате появилась возможность воспроизведения условий, при которых на определённом этапе развития функциональный пул белка альфа-синуклеина может быть истощён после инактивации его экспрессии.

Два других подраздела посвящены разработке и характеристике трансгенной линии FUS-протеинопатии. В данном случае в геном мышей были введены генетические конструкции с мутантной формой белка FUS человека. Этот блок представляет особый интерес, поскольку удалось воспроизвести патологический процесс не только на фенотипическом, но и на молекулярном уровне. Поскольку у животных в спинном и головном мозге детектируются FUS-позитивные отложения, схожие со структурами у пациентов с нейродегенеративными заболеваниями.

В итоговых двух разделах представлены результаты испытаний отечественного препарата Димебон и его новых фторированных аналогов. Эти результаты являются важным подтверждением использования общей концепции и выбранной стратегии при разработке препаратов для лечения нейродегенеративных процессов. Использование трансгенных животных моделей было ключевым фактором при оценке эффективности препаратов и поэтому выбор данной стратегии позволит проводить адекватный отбор и поиск новых препаратов, воздействующих на конкретные биологические мишени. В данном случае на патологическую агрегацию белка FUS.

Автореферат отражает основные положения диссертации.

Принципиальных замечаний по представленной к защите работе нет. Вместе с тем хотелось бы получить ответы на следующие вопросы:

1. В автореферате отсутствует раздел «Материал и методы исследования».

2. В обзоре литературы желательно было бы сделать небольшие заключения после каждого раздела, а в конце представить общее заключение, подводящее к общей концепции и цели работы.

2. Почему при описании трансгенных мышиных моделей предпочтение было отдано изучению функций белка FUS, а не TDP-43?

3. Каково развитие трансгенных моделей в будущем? Есть ли смысл в создании новых животных моделей и если да, то какие модели патологических процессов будут наиболее востребованы для фундаментальных исследований, а какие могут быть использованы для оценки эффективности препаратов?

4. Одним из ключевых механизмов гибели клеток при нейродегенерации можно отнести дисфункцию митохондрий. Каким образом или на каком этапе в полученных трансгенных моделях можно отследить развитие патологических процессов, связанных с потерей функции митохондрий?

5. При терапии Димебоном и другими препаратами на каких этапах развития модельных заболеваний проводилась терапия? Какие были последствия длительного приёма препаратов и как это сказывалось на развитие симптоматической фазу у животных?

6. В какой мере проведённый анализ транскриптома подтверждает выявленные когнитивные нарушения, и иммуноцитохимические изменения?

В целом данные замечания скорее можно отнести к интерпретации экспериментальной части и перспективам развития тематики, а не к качеству работы и ни в какой мере не снижают высокой научной значимости и практической ценности результатов исследования, а также не влияют на общую положительную оценку диссертации.

Заключение. Диссертация Устюгова Алексея Анатольевича «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 законченным трудом, выполненным на высоком современном методологическом уровне с использованием передовых технологий. Автором решена важная проблема по моделированию процессов патологической агрегации белков, приводящих к развитию нейродегенеративных заболеваний. Разработанные модели имеют

важное теоретическое значение для изучения фундаментальных молекулярных звеньев нейропатологии, а также высокую практическую значимость для разработки и поиска новых терапевтических препаратов для лечения нейродегенеративных заболеваний.

Представленная диссертация полностью 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
Главный научный сотрудник
лаборатории нейробиологии и основ развития мозга
Федерального государственного автономного учреждения
«Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

03.02.2021 _____ / Пинелис В.Г.

Подпись доктора медицинских наук Пинелиса В.Г. «удостоверяю»
Учёный секретарь
Федерального государственного автономного учреждения
«Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

Кандидат медицинских наук _____ / Тимофеева А.Г.

119296, Москва, Ломоносовский проспект, 2, стр.1
тел. +7499-134-30-83 Официальный сайт: http://nczd.ru , адрес электронной почты: director@nczd.ru