

«УТВЕРЖДАЮ»
Врио Директора
Федерального государственного
бюджетного научного учреждения
«Научно-исследовательский институт
нормальной физиологии
имени П.К. Анохина»
доктор медицинских наук,
профессор, член-корр. РАН
Судаков С.К.



15 января 2021

Отзыв

ведущей организации Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт нормальной физиологии имени П.К. Анохина» на диссертацию Устюгова Алексея Анатольевича на тему «Стратегия поиска препаратов для лечения нейродегенеративных заболеваний на основе трансгенных клеточных и животных моделей протеинопатий», представленной на соискание учёной степени доктора биологических наук по специальности 14.03.03 – патологическая физиология.

Актуальность темы. Рост нейродегенеративных заболеваний затрагивает интересы большого числа населения России и является серьёзной общемировой проблемой современной медицины. По данным ВОЗ, в мире насчитывается более 50 млн больных деменцией, а общее количество пациентов с нейродегенеративными заболеваниями (НДЗ), включая болезнь Альцгеймера, паркинсонизм, боковой амиотрофический, фронтотемпоральную лобарную дегенерацию и ряд других близких патологий приближается к 70 млн., и их количество из года в год

увеличивается примерно на 10 млн. Быстрый рост заболеваемости объясняется значительным увеличением продолжительности жизни, а также загрязнением окружающей среды в развитых странах. Для лечения НДЗ в настоящее время имеется крайне ограниченный набор лекарственных препаратов, которые, к тому же, имеют симптоматический тип действия и не препятствуют дальнейшему развитию патологии. Отчасти проблема разработки новых препаратов упирается в недостаточность адекватных модельных систем, которые могли бы служить в качестве тест-систем для отработки терапевтических подходов. Поэтому крайне актуальным является разработка новых моделей нейродегенеративных процессов как *in vitro*, так *in vivo*.

Несмотря на то, что нейродегенеративные заболевания характеризуются нарушением метаболизма и агрегацией определенных видов белков или наборов белков, а распределение белковых включений как внутри клетки, так и по отделам нервной системы значительно варьирует, схожий молекулярный механизм патогенеза позволил объединить подобные заболевания в одну группу – протеинопатий. Под протеинопатиями понимаются формы нейродегенеративных заболеваний, в основе патогенеза которых лежит изменение структуры, нарушение метаболизма и агрегация ряда белков, сопровождаемая формированием характерных гистопатологических белковых включений в разных отделах нервной системы. Такая классификация позволяет моделировать различные виды нейропатологий, используя современные методы по созданию трансгенных систем. Таким образом, диссертационная работа Устюгова А.А. по созданию трансгенных клеточных и животных моделей посвящена актуальной теме и может стать основой для изучения фундаментальных молекулярных механизмов нейродегенеративных

процессов, а также использовать разработанные модели для тестирования и отбора перспективных препаратов.

Связь с планом научных исследований. Диссертационная работа Устюгова А.А. на тему «Стратегия поиска препаратов для лечения нейродегенеративных заболеваний на основе трансгенных клеточных и животных моделей протеинопатий» выполнена в соответствии с тематикой и планом научной деятельности Федерального государственного бюджетного научного учреждения Института физиологически активных веществ. Работа соответствует специальности 14.03.03 – патологическая физиология.

Исследование проводилось в рамках:

1. Тематики научно-исследовательских работ Отдела медицинской и биологической химии ИФАВ РАН «Поиск и исследование механизмов действия нейропротекторов и стимуляторов когнитивных функций» (2015-2020 гг.)
2. Государственного контракта № 16.N08.12.1022 «Доклинические исследования лекарственного средства для лечения болезни Альцгеймера на основе диазобициклононана» (2012-2014 гг.)
3. Гранта РФФИ, №13-04-40379-Н «Изучение роли альфа-синуклеина в механизмах пластичности дофаминергических нейронов и патогенезе болезни Паркинсона» (2013-2015 гг.)
4. Гранта РФФИ, №16-04-01089 А «Биологическая роль стресс белков в норме и при нейропатологиях» (2016-2018 гг.)
5. Гранта РФФИ, № 14-23-00160 «Направленный дизайн, синтез и исследование биологической активности мультитаргетных

соединений в качестве инновационных препаратов для лечения нейродегенеративных заболеваний» (2014-2018 гг.)

Новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. В диссертационной работе Устюгова А.А. впервые созданы уникальные клеточные и трансгенные животные модели протеинопатий. Сравнительные исследования позволили автору вычленить ключевые патогенетические аспекты нейродегенеративных процессов и определить мишени, которые легли в основу моделирования агрегации белков схожими с патологическими процессами у больных с нейродегенеративными расстройствами. В частности, впервые были получены модели с регулируемой экспрессией белка альфа-синуклеина, который играет ключевую роль в патогенезе болезни Паркинсона. Такие модели позволяют провести анализ функции альфа-синуклеина в норме и патологии. Автором впервые проведён анализ двух новых моделей протеинопатий на основе эктопной экспрессии ключевого белка FUS в патогенезе боковом амиотрофического склероза и фронтотемпоральной лобарной дегенерации. В частности, проведена комплексная характеристика полученных новых оригинальных линий нейропатологий на животных, включающий оценку поведенческого фенотипа, когнитивных функций, биохимического и иммуногистохимического анализа нервных тканей с подробным описанием патологических процессов в сравнении с болезнями человека. Впервые на разработанных моделях протеинопатий были исследованы новые перспективные фторированные производные отечественного препарата Димебон, который

зарекомендовал себя в качестве потенциального средства для лечения нейродегенеративных состояний.

Выводы диссертации научно обоснованы и базируются на анализе обширного количества материала с применением современных (биохимических, молекулярных, иммуногистохимических, поведенческих) методов исследования, адекватных поставленным цели и задачам научной работы, что позволяет рекомендовать полученные данные к использованию в исследованиях по поиску и изучению новых молекулярных механизмов нейропатологий, а также отбору препаратов, воздействующих на патогенез нейродегенеративных заболеваний.

Научная и практическая значимость, полученных автором диссертации результатов. Фундаментальные данные, полученные в результате исследований, позволяют лучше понимать патологические процессы белковой агрегации, а также тонкие молекулярные механизмы при нейродегенеративных заболеваниях, что является важным аспектом для понимания патогенеза нейропатологий. Результаты проведённых исследований на модели с регулируемым нокаутом по альфа-синуклеину показывают, что снижение уровня альфа-синуклеина не вызывает долгосрочных неблагоприятных последствий для функциональности взрослых нейронов и поэтому может рассматриваться как безопасный вариант терапевтического вмешательства при синуклеинопатиях. Одновременно использование этой же линии очень важно для изучения нормальной функции альфа-синуклеина в отдельных популяциях нейронов, а также может быть использована для поиска новых терапевтических подходов. По аналогии, другие полученные трансгенные линии животных, основанные на сверхпродукции аберрантной

укороченной изоформы белка FUS, также важны для исследований патологических процессов нейродегенеративных состояний и отбора перспективных лекарственных средств. Это позволит снизить потери, наносимые социально-значимыми заболеваниями, и подчёркивает высокое значение диссертационной работы для медицины. Сопоставление результатов исследований с данными других авторов дают основания считать, что исследование работа является новым и достоверным трудом. В диссертационном исследовании приведён широкий спектр микрофотографий, таблиц и других данных, что позволяет объективно оценивать результаты работы.

Применение разработанных моделей отражены в ноу-хау №1-2012 «Методика отбора нейропротекторных препаратов, селективно действующих на системы клеточной защиты от патогенных белковых агрегатов, с использованием генетически-модифицированных животных» от 28.11.2012 (ИФАВ РАН), а также легли в основу патента РФ №2490268 (10.11.2011). WIPO (PCT): WO2009038764A1

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы. Фундаментальные знания и фактические данные, описанные в диссертации, могут быть использованы в работе научно-исследовательских коллективов, специализирующихся на этиологии и моделировании патогенеза нейродегенеративных процессов, а также другими заинтересованными учреждениями, например, биотехнологическими компаниями при разработке препаратов для лечения нейродегенеративных заболеваний. Материалы диссертации несут учебный потенциал и могут быть включены в состав курсов и лекций по нейропатологиям для студентов ВУЗов и аспирантов соответствующих

учреждений, специализирующихся на патофизиологии, клинической лабораторной диагностики, а также циклах профессиональной переподготовки в медицинских учреждениях для повышения квалификации.

Оценка структуры, языка и стиля диссертации. Диссертационная работа построена по классическому плану и включает введение, обзор литературы, описание методов и материалов, а также результаты исследования с их обсуждением, заключение, выводы и список цитируемой литературы, содержащей 613 источников (33 отечественных и 580 зарубежных). Материалы диссертационного труда изложены на 290 страницах машинописного текста и содержат 89 рисунков, шесть таблиц, одну схему и одно Приложение.

Во введении автор обосновывает актуальность выбранной темы исследования, её научную новизну, теоретическую и проклитическую значимость, характеризует свой личный вклад, формулирует цели и задачи исследования, а также положения выносимые на защиту.

Обзор литературы изложен на 69 стр., где в достаточном объёме рассмотрены и обобщены современные представления о протеинопатиях, молекулярных мишенях при нейродегенеративных процессах, а также текущих разработках лекарственных средств для лечения нейродегенеративных заболеваний. В литературном обзоре убедительно обосновывается необходимость выполнения диссертационной работы.

В разделе «Материалы и методы исследований» в хорошо структурированном виде представлено подробное описание всех экспериментальных методов, используемых в процессе выполнения

диссертационной работы, а также ссылки на работы с указанием первоисточника.

Глава 3 «Результаты и обсуждение» состоит из четырёх основных разделов, посвящённых отдельным аспектам диссертационной работы. Автор использует методы молекулярной и генетической инженерии проводит анализ наиболее актуальных мишеней-белков для создания клеточных линий протеинопатий, показывает динамику накопления патологических отложений, а также изучает их токсические эффекты для клеток. Проводит анализ доменной структуры белков и их влияния процессы патологической агрегации. Все вместе взятые данные, представленные в первом параграфе, свидетельствуют о том, что выбранные белки-мишени адекватно подходят для моделирования патологической белковой агрегации в клетке. Полученные автором данные расширяют знания об участии изученных белков в патогенезе нейродегенеративных процессов, поскольку приводится корреляция таких накоплений со структурами в нервных тканях пациентов с различными нейропатологиями.

В последующем подразделе фокус направлен на создание и характеристику линий трансгенных животных моделей нейродегенеративных процессов, которые включают в себя подразделы посвящённые созданию линий с регулируемой экспрессией гена альфа-синуклеина, а также эктопной экспрессией РНК/ДНК-связывающего белка FUS, участвующего в различных патологиях. При характеристике регулируемого нокаута альфа-синуклеина проводится гистопатологический анализ влияния экспрессии альфа-синуклеина на различные популяции нейронов трансгенных животных на разных стадиях онтогенеза. Проводится параллель использования методов регулируемой

экспрессии альфа-синуклеина в качестве терапевтического средства для лечения нейропатологий связанных с этим белком.

В двух других описанных трансгенных моделях протеинопатий, основанных на продукции укороченной формы белка FUS с изменённым или отсутствующим сигналом ядерной локализации и привнесёнными мутациями, встречающимися при боковом амиотрофическом склерозе и фронтотемпоральной лобарной дегенерации, автор изучает патологические процессы, возникающие в нейрональных тканях полученных трансгенных животных, проводит фенотипическую и генетическую характеристику. Используя разные молекулярные и гистохимические методы, автор наглядно показывает воспроизведённую патологическую картину модельных заболеваний, где основную патологическую функцию выполняет изменённая локализация и последующее накопление aberrantных форм белка FUS в нервных тканях животных, которые также сопоставляются со структурами в аутопсийном материале больных. Такая патология приводит к значительному нарушению локомоторных и когнитивных функций животных, а также драматически меняет экспрессию генов и дисрегуляции в метаболизме сфингоидных оснований на терминальных стадиях заболевания у животных.

Заключительные главы работы посвящены использованию гамма-карболинов, в частности отечественного препарата Димебон, в качестве средств для коррекции патологической агрегации белков. В данных разделах сравнивается использование препарата Димебон и его фторированных производных на протекание протеинопатий в клеточных и животных моделях. В результате проведённых исследований автор делает заключение, что соединения из ряда гамма-карболинов перспективны в

качестве потенциальных терапевтических средств, поскольку выступают в качестве стимуляторы когнитивных функций и тормозят развитие дисфункции опорно-двигательного аппарата у животных, моделирующих нейродегенеративные заболевания. Завершают содержательную часть выводы, которые логичным образом вытекают из результатов и обсуждения работы, а также соответствуют поставленной цели и задачам исследования.

Автореферат оформлен в соответствии с современными требованиями и отражает все необходимые разделы выполненной работы. Автореферат написан хорошим научным языком, грамматически и стилистически правильно, принципиальных замечаний по его содержанию нет. Тексты автореферата и публикаций автора соответствуют тексту диссертации, которая представлена целостно и логично, а также имеет существенную научную новизну и практическую значимость.

Обоснованность и достоверность научных положений и выводов.

Диссертационная работа Устюгова А.А. выполнена с использованием широкого набора современных методов исследований. Основная часть работы выполнена на созданных экспериментальных клеточных и трансгенных животных моделях протеинопатий. Ключевым аспектом моделирования стал процесс белковой агрегации, который является ключевым элементом при нейропатологиях. Для оценки накопления патологических агрегатов в клеточных моделях использовались современные методы микроскопического анализа, а также биохимические подходы по характеристике агрегатов с помощью дифференциального центрифугирования и последующего иммуноблоттинга. Для оценки экспрессии таргетного гена при моделировании альфа-синуклеинопатии в

нокаутных животных моделях использовались методы ОТ-ПЦР, а также проведён широкий гистохимический анализ структур нервных тканей животных, подтверждённый иммуноблоттингом со специфичными антителами к альфа-синуклеину. Патоморфологическая оценка нервных тканей также проводилась на трансгенных моделях FUS-протеинопатий, где были выявлены FUS-позитивные накопления, а также проведён их биохимические и иммуногистохимический анализ. На этих же животных проведён использован метод РНК-секвенирования, позволивший выделить семейства генов с изменённой экспрессией на поздних стадиях заболевания животных.

В работе использованы современные и корректные методы статистической обработки данных в зависимости от применяемых исследовательских подходов при анализе распределения или непараметрической статистики. Выводы, теоретические выкладки и практические рекомендации диссертационной работы Устюгова А.А. основаны на достаточном объёме наблюдений, необходимым количеством животных в экспериментальных группах, а также биологических реплик при анализе экспрессии и РНК-секвенировании.

Результаты работы были изложены автором и обсуждены на российских и международных конференциях. По материалам диссертационной работы опубликовано 46 научных работ на русском и английском языке (16 статей в изданиях, входящих в Q1/Q2), из них 31 статья в журналах, которые рекомендованы ВАК Минобрнауки РФ для публикации материалов диссертационных работ.

Замечания и вопросы по диссертационной работе

Диссертационная работа Устюгова А.А. принципиальных замечаний не имеет. Работа изложена хорошим академическим языком, результаты исследований описаны последовательно и логично с широким подбором иллюстративного материала. Замечаний по работе нет, однако после ознакомления с работой остаётся ряд вопросов:

1. Существует несколько десятков моделей нокаутов альфа-синуклеинов. В чём всё же выражается уникальность разработанной линии альфа-синуклеинового нокаута?
2. В работе описаны и охарактеризованы клеточные и трансгенные животные модели протеинопатий, проведено тестирование препаратов, при этом хотелось бы узнать в чём заключается стратегия поиска препаратов?

Заданные вопросы по диссертационной работе в целом не снижают новизну и ценность исследования, теоретическую и практическую значимость.

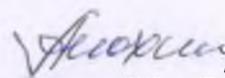
Заключение

Диссертационная работа Устюгова Алексея Анатольевича на тему «Стратегия поиска препаратов для лечения нейродегенеративных заболеваний на основе трансгенных клеточных и животных моделей протеинопатий», представленной на соискание учёной степени доктора биологических наук по специальности 14.03.03 – патологическая физиология, представляет собой завершённую научно-квалификационную работу, содержащую новое решение актуальной задачи современной патофизиологии: моделирование нейродегенеративных процессов в клеточных и животных трансгенных моделях. Диссертация соответствует пункту 9 Положения «О порядке присуждения учёных степеней»,

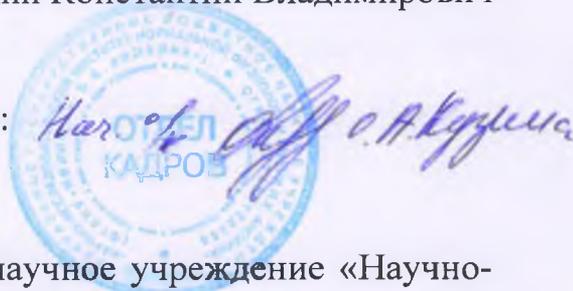
утверждённого Постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24 сентября 2013 года (в редакции Постановления Правительства Российской Федерации №1168 от 01 октября 2018г.), а её автор, Устюгов Алексей Анатольевич, заслуживает присуждение степени доктора биологических наук по специальности 14.03.03 – патологическая физиология.

Отзыв обсуждён и утверждён на общем собрании сотрудников лабораторий нейробиологии памяти, функциональной нейрохимии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт нормальной физиологии имени П.К. Анохина», протокол № 1 от 14 января 2021 г.

Заведующий лабораторией нейробиологии памяти
ФГБНУ «НИИНФ им. П.К. Анохина»
доктор медицинских наук, профессор, академик РАН

 Анохин Константин Владимирович

Подпись, профессора Анохина К.В. заверяю:



Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт нормальной физиологии имени П.К. Анохина», 125315, г. Москва, ул. Балтийская, д. 8, тел. +7 (495) 601-22-45, адрес электронной почты: nphys@nphys.ru, официальный сайт: <http://nphys.ru/>

Отзыв отправляется в диссертационный совет Д 001.003.01 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», 125315, г. Москва, ул. Балтийская, д. 8