

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 208.072.04 НА БАЗЕ
ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО АВТОНОМНОГО
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«РОССИЙСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.И.ПИРОГОВА»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ ДОКТОРА
БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК

аттестационное дело № _____

решение Диссертационного совета от 22.09.2021 г. № 01

О присуждении Кухарскому Михаилу Сергеевичу, гражданину Российской Федерации, ученой степени доктора биологических наук.

Диссертация «Нарушение функций рибонуклеопротеиновых комплексов в патогенезе бокового амиотрофического склероза» по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология (биологические науки) принята к защите 19.05.2021 г. протокол № 01 диссертационным советом Д 208.072.04 на базе Федерального государственного автономного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (приказ №105 от 11.04.2012 г.), адрес: 117997, Москва, ул. Островитянова, д. 1.

Соискатель Кухарский Михаил Сергеевич, 1986 года рождения, в 2010 г. окончил Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Томский государственный университет» по специальности «Биология». В 2013 году в Институте биохимии имени А.Н. Баха РАН защитил кандидатскую диссертацию на тему «Эффект производных гамма-карболина на прогрессию протеинопатии в трансгенных моделях болезни Альцгеймера» по специальности 03.01.04 – Биохимия. Работает с 2012 г. в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте физиологически активных веществ Российской академии наук в лаборатории

генетического моделирования нейродегенеративных процессов в должности старшего научного сотрудника, с 2018 г. – доцент кафедры общей и клеточной биологии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования "Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова" Министерства здравоохранения Российской Федерации. Диссертация выполнена в лаборатории генетического моделирования нейродегенеративных процессов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт физиологически активных веществ Российской академии наук и на кафедре общей и клеточной биологии МБФ Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования "Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова" Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научные консультанты:

Скворцова Вероника Игоревна, доктор медицинских наук, профессор, член-корр. РАН, руководитель Федерального медико-биологического агентства;

Наталья Николаевна Нинкина, доктор медицинских наук, заведующая лабораторией генетического моделирования нейродегенеративных процессов Института физиологически активных веществ Российской академии наук.

Официальные оппоненты:

– Абрамов Андрей Юрьевич – доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией клеточной физиологии и патологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева»;

– Анохин Константин Владимирович – доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, директор Института перспективных исследований мозга Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»;

– Ярыгин Константин Никитич – доктор биологических наук, профессор,

член-корреспондент РАН, заведующий лабораторией клеточной биологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» – дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, в своем положительном заключении (Протокол №5 от 12.08.2021 г.), подписанном доктором биологических наук, профессором, академиком РАН, заведующим лабораторией нервных и нейроэндокринных регуляций ФГБУН Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, утвержденном доктором биологических наук, профессором, член-корреспондентом РАН, Васильевым А.В., директором ФГБУН Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, указала, что диссертационная работа Кухарского Михаила Сергеевича на тему «Нарушение функций рибонуклеопротеиновых комплексов в патогенезе бокового амиотрофического склероза» является целостной научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований раскрывается крупное научное направления по изучению механизмов молекулярного патогенеза БАС и родственных заболеваний, что имеет важное значение для разработки новых стратегий для поиска эффективных методов терапии. Диссертация соответствует требованиям пункта 9 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24 сентября 2013 года (в редакции Постановления Правительства Российской Федерации №1168 от 01 октября 2018 г.) предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а ее автор Кухарский Михаил Сергеевич заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология.

Выбор официальных оппонентов обоснован тем, что доктор биологических наук, профессор Абрамов Андрей Юрьевич, доктор медицинских наук, профессор Анохин Константин Владимирович, доктор медицинских наук, профессор Ярыгин

Константин Никитич являются ведущими специалистами в области клеточной биологии и изучения нервной системы, в том числе патологических состояний и потенциальных способов их коррекции; оппоненты известны своими работами в данной области исследований, в рецензируемых научных изданиях.

Выбор ведущей организации обоснован тем, что ФГБУН Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН является одним из ведущих научных институтов и известен своими исследованиями и публикациями, близкими к теме диссертации, способен оценить научную новизну и практическую значимость полученных результатов данной диссертации и дал свое согласие.

По теме диссертации опубликовано 40 научная работа, из них 23 научные статьи, в том числе 10 в рецензируемых научных изданиях, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук, утвержденный ВАК Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, 12 статей в зарубежных рецензируемых научных изданиях, индексируемых в международных реферативных базах данных Scopus и Web of Science, 14 тезисов докладов научных конференций, 3 патента.

Общий объем публикаций составил 5,15 печатных листа и содержит 90%, авторского вклада. Оригинальность диссертационной работы, определенная по системе «Антиплагиат», составляет 92,44%.

Наиболее значимые научные работы по теме диссертации:

1. Kukharsky M.S. In a search for efficient treatment for amyotrophic lateral sclerosis: Old drugs for new approaches / Kukharsky M.S., Skvortsova V.I., Bachurin S.O., Buchman V.L. // Med Res Rev. – 2020. DOI: 10.1002/med.21725.
2. Kukharsky M.S. Long non-coding RNA Neat1 regulates adaptive behavioural response to stress in mice / Kukharsky M.S., Ninkina N.N., An H., Telezhkin V., Wei W., Meritens C.R., Cooper-Knock J., Nakagawa S., Hirose T., Buchman V.L., Shelkovnikova T.A. // Transl Psychiatry. – 2020. – V. 10. – № 1. – P. 171.

3. Kukharsky M.S. Protective paraspeckle hyper-assembly downstream of TDP-43 loss of function in amyotrophic lateral sclerosis / Shelkovich T.A., Kukharsky M.S., An H., Dimasi P., Alexeeva S., Shabir O., Heath P.R., Buchman V.L. // *Mol Neurodegener.* – 2018. – V. 13. – № 1. – P. 30.
4. Kukharsky M.S. Chronically stressed or stress-preconditioned neurons fail to maintain stress granule assembly / Shelkovich T.A., Dimasi P., Kukharsky M.S., An H., Quintiero A., Schirmer C., Buee L., Galas M.C., Buchman V.L. // *Cell Death Dis.* – 2017. – V. 8. – № 5. – P. e2788.
5. Kukharsky M.S. Early lethality and neuronal proteinopathy in mice expressing cytoplasm-targeted FUS that lacks the RNA recognition motif / Robinson H.K., Deykin A.V., Bronovitsky E.V., Ovchinnikov R.K., Ustyugov A.A., Shelkovich T.A., Kukharsky M.S., Ermolkevich T.G., Goldman I.L., Sadchikova E.R., Kovrazhkina E.A., Bachurin S.O., Buchman V.L., Ninkina N.N. // *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener.* – 2015. – V. 16. – № 5-6. – P. 402-9.
6. Kukharsky M.S. Calcium-responsive transactivator (CREST) protein shares a set of structural and functional traits with other proteins associated with amyotrophic lateral sclerosis / Kukharsky M.S., Quintiero A., Matsumoto T., Matsukawa K., An H., Hashimoto T., Iwatsubo T., Buchman V.L., Shelkovich T.A. // *Mol Neurodegener.* – 2015. – V. 10. – № 1. – P. 20.

На автореферат поступили отзывы от:

Владимира Александровича Митькевича – доктора биологических наук, главного научного сотрудника ФГБУН Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН. Отзыв на автореферат содержит оценку актуальности и научной новизны диссертационной работы. Диссертация представляет собой обширное, многолетнее, логически выверенное исследование, включающее характеристику нескольких молекулярно-генетических факторов участвующих в развитии БАС. Диссертация полностью соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук. Отзыв положительный, критических замечаний не содержит.

Павла Георгиевича Георгиева – доктора биологических наук, профессора, академика, и.о. директора ФГБУН Института биологии гена РАН. Отзыв на автореферат содержит оценку актуальности и научной новизны диссертационной работы. Диссертация представляет собой законченное исследование, в котором были успешно выполнены все поставленные задачи. Автореферат достаточно полно отражает суть исследования. Диссертационная работа соответствует требованиям ВАК, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук. Отзыв положительный, критических замечаний не содержит.

Рауля Радиковича Гайнетдинова – кандидата медицинских наук, профессора, директора Института трансляционной биомедицины Санкт-петербургского государственного университета. Отзыв на автореферат содержит оценку важности изучаемой проблемы, научной новизны и практической значимости представленного исследования. С учетом актуальности, новизны и научно-практической значимости полученных результатов, можно заключить, что диссертационная работа полностью соответствует требованиям, предъявляемым к докторским диссертациям. Отзыв положительный, критических замечаний не содержит.

Татьяны Александровны Бережновой – доктора медицинских наук, доцента, декана фармацевтического факультета, заведующей кафедрой фармакологии ФГБОУ ВО ВГМУ им. Н.Н. Бурденко Минздрава России. Отзыв на автореферат отмечают высокую актуальность, своевременность и практическую значимость проведенного исследования. Работа формирует новый взгляд на механизмы развития нейродегенеративных заболеваний, в частности БАС и привносит новые интересные данные в современную нейрофизиологию. Работа соответствует требованиям ВАК, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора биологических наук. Отзыв положительный, критических замечаний не содержит.

Татьяны Васильевны Проскуряковой – доктора биологических наук, доцента, главного научного сотрудника лаборатории психофармакологии ННЦ наркологии-филиала ФГБУ «НМИЦ ПН им. В.П. Сербского» Минздрава России.

Отзыв на автореферат содержит оценку актуальности, научной новизны, практической и теоретической значимости исследования. Диссертационная работа вносит существенный вклад, как теоретический, так и практический в исследования, посвященные БАС. Полученные результаты также могут быть использованы для моделирования патологических состояний и доклинического тестирования потенциальных лекарственных препаратов. Диссертация соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук. Отзыв положительный, критических замечаний не содержит.

Элеонора Александровна Брага – доктора биологических наук, профессора, главного научного сотрудника лаборатории патогеномики и транскриптомики ФГБНУ «НИИ ОПП». Отзыв на автореферат содержит оценку актуальности, научной новизны, практической и теоретической значимости исследования. В целом работа представляется хорошо выстроенным исследованием, основывающемся на богатом фактическом материале. Выводы соответствуют поставленным задачам. В ходе выполнения работы использовался богатый набор методов, позволивших подтвердить сделанные наблюдения на разных уровнях организации. Результаты работы представляют большую значимость для нейронауки, так как формируют новый интересный взгляд на патогенез БАС и дополняют последние исследования в данной области. Диссертационная работа полностью отвечает требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук. Отзыв положительный, критических замечаний не содержит.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

– **изучены** важные аспекты патогенеза бокового амиотрофического склероза (БАС), касающиеся нарушения функций специфических рибонуклеопротеиновых

комплексов в клетках нервной системы, что является одним из наиболее общих механизмов развития заболевания;

– **показано**, что в аутопсийном материале больных как со спорадическими, так и с семейными формами БАС в нейронах спинного мозга обнаруживаются внутриядерные структуры – параспеклы, образующиеся на основе длинной некодирующей РНК *Neat1*;

– **впервые был раскрыт механизм**, активирующий сборку параспеклов при БАС, в основе которого лежит нарушение функции белка TDP-43 в ядрах клеток, что приводит к нарушению биогенеза микроРНК, накоплению двухцепочечных РНК и активации сигнального пути интерферонов I типа;

– **доказано**, что образование параспеклов в нервных клетках является адаптивной реакцией и играет протекторную роль, а в случае нарушения данного процесса усиливается клеточная гибель;

– **в работе впервые была поведена** подробная фенотипическая характеристика линии мышей нокаутных по гену *Neat1*, в результате чего было показано, что целый ряд клинических проявлений, характерных для нейродегенеративных и психических заболеваний может быть объяснен нарушением функций данной РНК;

– **было установлено**, что отсутствие РНК *Neat1* у модельных животных повышает возбудимость нейронов и приводит к нарушению адаптивного поведенческого ответа на стрессовые стимулы;

– **впервые был выполнен** анализ транскриптомов тканей коры головного мозга нокаутных по гену *Neat1* мышей и выявлены группы генов, экспрессия и сплайсинг которых изменяются при отсутствии РНК *Neat1*. Биоинформатический анализ этих генов **позволил определить метаболические пути**, задействованные в клеточном ответе на нарушение функции РНК *Neat1* в нервной системе. В частности, дифференциально сплайсирующиеся гены оказались связаны с такими клеточными функциями как процессинг РНК и синаптическая передача. Выделяется ряд генов, ассоциированных с психическими расстройствами у человека;

- **охарактеризованы** агрегационные свойства белка CREST, мутации в котором приводят к развитию семейных форм БАС. В результате показано, что высокий уровень данного белка в клетках приводит к его ядерной агрегации даже в случае нативной структуры белка;
- **установлено**, что белок CREST участвует в образовании параспеклов в ядрах и стресс-гранул в цитоплазме клеток. При агрегации белок CREST теряет свои функции и более того вовлекает в агрегаты другие белки, с которыми он связывается в клетке, в частности белок параспеклов FUS, что в свою очередь нарушает нормальный физиологический путь формирования параспеклов;
- **показано**, что повышение уровня как нативного белка CREST, так и его мутантных форм подавляет рост и ветвление нейритов в первично-культивируемых нейронах.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

- **доказано**, что белки, склонные к агрегации (TDP-43, CREST, FUS) в клетках нервной системы участвуют в сборке специфических рибонуклеопротеиновых комплексов и способны регулировать их работу, в том числе в условиях развития нейродегенерации;
- **охарактеризовано** значение длинной некодирующей РНК Neat1 для функционирования нейронов и нервной системы в целом. Полученные результаты, указывающие на то, что РНК Neat1 регулирует возбудимость нервных клеток, а также адаптацию к стрессу на уровне целого организма важны как с точки зрения фундаментальных аспектов клеточной биологии, так и для разработки новых методов воздействия на функциональное состояние клеток, тканей, и систем органов, в частности нервной;
- **предложена концепция**, согласно которой, нарушение функций рибонуклеопротеиновых комплексов, в частности параспеклов и стресс-гранул является одним из механизмов селективной гибели двигательных нейронов при БАС;
- описание механизмов, приводящих к нарушению метаболизма белков и РНК входящих в состав рибонуклеопротеиновых комплексов, **позволяет существенно**

расширить современные представления об особенностях функционирования клеток нервной системы и событиях, приводящих к развитию и прогрессии заболеваний, а также выявить ключевые звенья этого процесса, воздействие на которые позволит подавить или остановить нейродегенеративный процесс. Данные, полученные в ходе выполнения работы формируют новое направление исследований роли рибонуклеопротеиновых комплексов и входящих в их состав белков и РНК в функционировании нервной системы в норме и при развитии патологических состояний;

– полученные в диссертационной работе данные **вносят значительный вклад** в понимание клеточных и молекулярных механизмов развития бокового амиотрофического склероза и родственных заболеваний;

– **применительно к проблематике диссертации** результативно и эффективно использован комплекс современных методов исследования по работе с клеточными культурами, гистологический анализ, в том числе *in situ* гибридизация, методы молекулярной биологии, биохимии, биоинформатики, а также использовались генетически-модифицированные животные.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:

– **определены** новые молекулярные мишени для воздействия на процессы регуляции функций клеток нервной системы в норме и при патологии, которые могут быть использованы для разработки новых терапевтических подходов в лечении тяжелых и социально-значимых заболеваний человека

– **созданы** новые методы моделирования патологических событий, характерных для ряда форм нейрональной дисфункции на клеточном и организменном уровне;

– **разработаны** связанные с нарушением функций молекулярных компонентов рибонуклеопротеиновых комплексов новые подходы к характеристике форм бокового амиотрофического склероза;

– материалы диссертации внедрены в учебный процесс на кафедре общей и клеточной биологии медико-биологического факультета Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего

образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации. В частности, в рамках дисциплин «Клеточная биология и основы патологии», «Иммуногистохимия» изучаются ткани трансгенных и нокаутных животных, в которых моделируются патологические события, связанные с нарушением образования рибонуклеопротеиновых комплексов и белковой агрегацией. Изучаются маркеры адаптационных и патологических изменений в нервной системе генетически модифицированных мышей, рассматриваются теоретические основы патогенеза протеинопатий и нарушений белкового гомеостаза при клеточном стрессе.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что выводы сделанные по результатам исследования базируются на обширном экспериментальном материале, при привлечении для сравнения данных, опубликованных ведущими мировыми лабораториями по теме исследования нейродегенеративных заболеваний и занимающихся разработкой генетических моделей болезней человека.

Для выполнения экспериментальных работ использовались современные методы и подходы, полностью соответствующие поставленным в работе задачам. Использованы адекватные методы сбора и обработки информации, в том числе современные программные пакеты для статистического анализа данных. Достоверность сделанных выводов также обеспечивается воспроизводимостью полученных результатов на разных уровнях с использованием различных методических подходов и тест-систем.

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном участии на всех этапах исследования. Были самостоятельно проанализированы данные отечественной и зарубежной литературы по теме диссертации, оценены результаты исследования, проведено планирование общей концепции исследования и постановка целей и задач. Выполнены экспериментальные работы и анализ полученных результатов, подготовка и публикация статей по теме диссертации. Автор лично представлял результаты настоящего исследования на

отечественных и зарубежных научных конференциях. Диссертантом лично проведена подготовка и публикация статей по теме диссертации и подготовлена рукопись диссертации.

На заседании 22 сентября 2021 года Диссертационный Совет Д208.072.04 принял решение присудить Кухарскому Михаилу Сергеевичу ученую степень доктора биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология.

При проведении тайного голосования Диссертационный совет Д208.072.04 в количестве 16 человек, из них 10 докторов наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология, участвовавших в заседании, из 23 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за присуждение ученой степени - 16, против присуждения ученой степени - нет, недействительных бюллетеней - нет.

Председатель
Диссертационного совета,
доктор медицинских наук,
профессор



Мишнев Олеко Дмитриевич

Заместитель председателя
Диссертационного совета,
доктор медицинских наук,
профессор



Глинкина Валерия Владимировна

24.09.2021г.

