

## ОТЗЫВ

официального оппонента,

доктора биологических наук, члена-корреспондента РАН, профессора,  
заведующего лабораторией клеточной биологии Федерального  
государственного бюджетного научного учреждения «Научно-  
исследовательского института биомедицинской химии имени В.Н.  
Ореховича»

Ярыгина Константина Никитича

на диссертацию Кухарского Михаила Сергеевича на тему «Нарушение функций рибонуклеопротеиновых комплексов в патогенезе бокового амиотрофического склероза», представленной к защите на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология.

Несмотря на многолетние исследования этиологии и патогенеза бокового амиотрофического склероза (БАС), непосредственные внутриклеточные механизмы, которые приводят к избирательной гибели двигательных нейронов остаются неясными. На данный момент это фатальное заболевание остается неизлечимым. Два препарата – рилузол и эдаравон, одобренных для применения в клинической практике оказывают лишь незначительный эффект на течение болезни. Мировым научным сообществом предпринимаются значительные усилия для поиска новых подходов к лечению. Следует признать, что одной из объективных причин неуспешности таких попыток является недостаточная изученность молекулярных мишеней для воздействия, а также биомаркеров, которые можно использовать для ранней диагностики и отслеживания развития болезни.

В этой связи, представленная диссертационная работа М.С. Кухарского, посвященная изучению молекулярно-клеточных механизмов патогенеза бокового амиотрофического склероза, отражает очевидную научную и социальную значимость изучаемой проблемы и является актуальной.

Диссертационная работа М.С. Кухарского изложена по традиционной схеме и содержит следующие разделы: «Введение», «Обзор

литературы», «Материалы и методы исследования», «Результаты исследования и их обсуждение», «Заключение», «Выводы» и «Список цитируемой литературы». Работа изложена на 311 страницах, содержит 5 таблиц и 65 рисунков. Список цитируемой литературы включает 781 наименование, из них 11 в отечественных и 770 в зарубежных научных изданиях.

Во введении дается обоснование актуальности и значимости выбранной темы, определяются цель и задачи исследования. Задачи прописаны ясно и закладывают логическую структуру для последующего восприятия работы. Обоснованность и достоверность приведенных положений, выносимых на защиту, не вызывает сомнений.

Глава «Обзор литературы» содержит обширный материал и в ней дан анализ современного состояния исследуемой проблемы, представлены результаты ведущих научных школ, занимающихся изучением БАС. В литобзоре рассматривается несколько важных тем. Прежде всего приводятся общие сведения о наиболее распространенных нейродегенеративных заболеваниях, их клинических и патогенетических особенностях. Далее рассматриваются основные существующие и потенциальные биомаркеры для нейродегенеративных заболеваний. Отдельно автор останавливается на разборе явления белковой агрегации как главного патогенетического звена таких болезней и конкретно БАС. Значительная часть обзора посвящена рассмотрению нарушений белкового гомеостаза в клетке, которое сопровождает нейродегенерацию и в том числе приводит к формированию стресс-гранул. После этого приводятся сведения о длинных некодирующих РНК и их значении для развития заболеваний мозга. И наконец последний раздел литературного обзора посвящен подробному разбору клинических испытаний, проводящихся на пациентах с БАС. В данном разделе информация по препаратам сгруппирована по принципу их влияния на те или иные аспекты физиологии, что дает представление о механизмах их действия и облегчает сравнение друг с другом. В качестве замечания к литературному обзору хотелось бы указать на не очень подробное описание клинической картины БАС и его патогенеза.

Раздел «Материалы и методы исследования» описывает методы, которые были использованы для решения поставленных задач. Все протоколы изложены лаконично, но достаточно информативно. Большая

часть работы была выполнена с использованием клеточных культур в качестве объекта, при этом использовались передовые методы. Для подавления экспрессии генов применялись соответствующие малые интерферирующие РНК. Для усиления экспрессии или экспрессии мутантных вариантов белков использовалась трансфекция культур плазмидами, несущими необходимые генетические конструкции. В качестве моделей использовались как обычные клеточные культуры типа MCF или SH-SY5Y, так и более специфические, например, двигательные нейроны, дифференцированные из ЭСК, а также первичные гиппокампальные культуры мыши. Потеря функции РНК *Neat1* моделировалась в нокаутной линии мышей, что позволило произвести оценку ее функций на уровне целостного организма, что крайне важно с точки зрения понимания того, как нарушения на молекулярном и клеточном уровне могут отражаться на уровне системы органов и организма в целом. Большую ценность представляют результаты, полученные на аутопсийном материале от пациентов с БАС. Было убедительно показано, что образование параспеклов является характерным признаком всех форм БАС.

Самым важным результатом работы, на мой взгляд, является то, что был раскрыт механизм, посредством которого в ответ на развитие нейродегенеративного процесса в клетках активируется сборка параспеклов. Снижение уровня белка TDP-43 в ядрах клеток приводило к нарушению процессов образования и созревания микро-РНК, это вело к накоплению длинных двухцепочечных транскриптов – предшественников микро-РНК, что в свою очередь запускало в клетках ответ, подобный тому, который запускается при вирусной инфекции, в первую очередь активацию интерферонов. Важно, что сборка параспеклов оказывала антиапоптотическое действие на клетки.

Так как основным структурным элементов параспеклов является длинная некодирующая РНК *Neat1*, далее автор концентрируется на изучении последствий нарушения в работе данной РНК в мышечной модели. В результате показано, что *Neat1* участвует в регуляции психических функций, задействованных при адаптации животного к стрессовым условиям. В нескольких классических поведенческих тестах автор обнаружил проявления гипоактивности, которая при стрессе сменяется гиперактивностью, импульсивное поведение, отсутствие

социального интереса. При этом когнитивные или моторные функции у животных не страдали. Не наблюдалось отклонений в организации нервной системы и на гистологическом уровне. В то же время полногеномный анализ экспрессии показал, что некоторые гены, связанные с важными функциями нервной системы, изменяют свою активность, а также претерпевают альтернативный сплайсинг. На клеточном уровне, используя первичные культуры нейронов, удалось показать, что при отсутствии *Neat1* нейроны проявляют большую возбудимость.

Заключительная глава диссертации, посвященная белку CREST, в меньшей степени вписывается в общую канву исследования, за исключением того факта, что CREST оказывает влияние на формирование параспеклов. Этот белок генетически ассоциирован с БАС и автор в своем исследовании показывает его негативный эффект на нервные клетки.

Вопросы по результатам работы следующие:

1. Известно ли что-то о последствиях агрегации CREST в животных моделях?
2. Так как нарушение функций *Neat1* у нокаутных мышей приводило к развитию симптомов характерных для психических заболеваний, многие из которых рассматриваются как расстройства развития, возникает вопрос, что известно о роли параспеклов и *Neat1* с точки зрения индивидуального развития организма?

Сделанные замечания в целом, не меняют общую положительную оценку диссертации, поскольку не касаются существа работы и не ставят под сомнения положения, выносимые на защиту.

Характеризуя диссертацию в целом, следует отметить, что работа представляет собой обширное многостороннее исследование, результатом которого явилось обоснование нового общего патогенетического фактора БАС, которым является нарушение функций таких рибонуклеопротеиновых комплексов как параспеклы и стресс-гранулы и/или их структурных компонентов. Работы выполнены с использованием широкого круга подходов на стыке наук, что является современной тенденцией анализа и представления научных данных. Все результаты диссертации опубликованы в высокорейтинговых журналах и

востребованы научным сообществом. Диссертация хорошо оформлена и качественно проиллюстрирована. В автореферате в краткой форме представлены все результаты, описанные в диссертационной работе. Выводы абсолютно обоснованы и соответствуют поставленным задачам.

Диссертационная работа Кухарского Михаила Сергеевича «Нарушение функций рибонуклеопротеиновых комплексов в патогенезе бокового амиотрофического склероза» удовлетворяет всем 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 докторским диссертациям, а ее автор, Кухарский Михаил Сергеевич, заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология.

Официальный оппонент

Заведующий лабораторией клеточной биологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательского института биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича»

доктор биологических наук, член-корреспондент РАН, профессор

Константин Никитич Ярыгин

6.09.2021

Подпись

заверяю

Ученый секретарь ИБМХ к.х.н. Карлова Е.А.

