

«УТВЕРЖДАЮ»

директор Федерального государственного
бюджетного учреждения науки Института
биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН
д-р. биол. наук, чл.-корр. РАН



А. В. Васильев

2 сентября 2021 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН на диссертационную работу Кухарского Михаила Сергеевича «Нарушение функций рибонуклеопротеиновых комплексов в патогенезе бокового амиотрофического склероза», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности: 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология (биологические науки).

Актуальность темы выполненной работы. Нейродегенеративные заболевания (НДЗ) – широко распространённые неизлечиваемые социально значимые заболевания центральной нервной системы. К ним относятся болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, хоря Гентингтона, фронтотемпоральная дегенерация, боковой амиотрофический склероз (БАС) и др. Несмотря на системный характер НДЗ, ключевым элементом патогенеза каждого из них является избирательная гибель определенной популяции нейронов и нарушение регулируемой ими функций. Не менее важной особенностью патогенеза НДЗ является то, что первые клинических симптомы, по которым их диагностируют, появляются только через много лет после начала патологических процессов при гибели большей части специфических нейронов. Обусловленное этим позднее начало лечения, в основном симптоматическое, малоэффективно. Число больных НДЗ в развитых странах быстро растет, что обусловлено как минимум двумя причинами, загрязнением окружающей среды и увеличением продолжительности жизни.

Несмотря на многолетние усилия по борьбе с НДЗ до сих пор не решены важнейшие задачи - не разработаны ни методы ранней диагностики, ни превентивная

нейропротекторная терапия. Все применяемые в настоящее время лекарственные средства относятся к симптоматической терапии, практически не оказывая влияния на причины и механизмы развития патологии. Ни один из разрабатываемых новых препаратов для патогенетической терапии не прошел III стадии клинических испытаний. Одним из основных препятствий для разработки эффективных методов ранней диагностики и терапии является недостаток фундаментальных знаний о механизмах патогенеза НДЗ на молекулярном и клеточном уровнях.

Исходя из выше изложенного, усилия огромной армии ученых и клиницистов направлены на разработку ранней и дифференциальной диагностики НДЗ, а также на разработку превентивной терапии и усовершенствование симптоматической терапии. При этом исследователи исходят из методологии трансляционной медицины, согласно которой новые фундаментальные знания молекулярных механизмов патогенеза НДЗ позволят разработать новые и усовершенствовать существующие технологии диагностики и лечения. Одной из ключевых причин гибели нейронов при НДЗ является так называемые протеинопатии, т.е. нарушение метаболизма белков, которые, как правило, сопровождаются их накоплением, агрегированием и конформационными изменениями. При этом функционально значимые белки превращаются в токсины, вызывающие гибель нейронов. Так, в поврежденных клетках наблюдается образование специфических рибонуклеопротеиновых комплексов – «стресс-гранул». Для некоторых НДЗ, в частности БАС и фронто-темпоральной деменции, показана непосредственная вовлеченность компонентов различных рибонуклеопротеиновых комплексов в патогенез этих заболеваний. Диссертационная работа Кухарского Михаила Сергеевича и посвящена изучению роли рибонуклеопротеиновых комплексов в патогенезе БАС. Автор диссертации исходит из того, что изучение механизмов функционирования таких комплексов в норме, а также их изменений при патологии, поможет лучше понять молекулярные механизмы патогенеза НДЗ и в частности БАС. В свою очередь, полученные новые фундаментальные знания откроют новые перспективы в области разработки новых и усовершенствования существующих методов диагностики и лечения.

Связь с планами соответствующих отраслей наук. Диссертационная работа Кухарского М.С. выполнена в соответствии с основными направлениями программы научных исследований Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования "Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова" Министерства здравоохранения

Российской Федерации и Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт физиологически активных веществ Российской академии наук.

Научная новизна исследования и полученных результатов. В представленной диссертационной работе приведены данные по углубленному исследованию роли ряда белков и РНК Neat1, участвующих в образовании рибонуклеопротеиновых комплексов, в патологических механизмах, приводящих к развитию нейродегенеративных процессов, характерных для БАС. Ранее в литературе уже было показано, что в мотонейронах спинного мозга у пациентов при БАС обнаруживаются внутриядерные структуры – параспеклы. Однако было не понятно, встречаются ли они при семейных или спорадических формах БАС. В диссертационной работе, на аутопсийном материале больных, впервые было показано, что параспеклы обнаруживаются как при семейных, так и при спорадических формах БАС. Это означает, что параспеклы являются общим признаком поражения двигательных нейронов при БАС независимо от его происхождения. Кроме того, при моделировании патологических процессов на клетках (*in vitro*) впервые был описан каскад внутриклеточных событий, приводящих к формированию параспеклов. Так, вначале происходит нарушение ядерной функции белка TDP-43, что приводит к нарушению биогенеза miRNA и активации сигнального пути интерферонов I типа. В совокупности эти процессы приводят к активации сборки параспеклов, которые в нейронах играют протекторную роль, препятствуя апоптозу.

По данным литературы, ключевым структурным компонентом параспеклов является длинная некодирующая РНК Neat1. Функции этой РНК остаются во многом непонятными. Для выяснения этого вопроса в диссертации моделировали потерю функции Neat1, используя оригинальную линию мышей с генетическим нокаутом Neat1. На первичной культуре нейронов этих трансгенных животных было показано, что отсутствие Neat1 изменяет возбудимость нейронов, а на уровне целого организма приводит к нарушению поведенческого адаптивного ответа на стрессовые стимулы. Диссертантом также впервые было выполнено исследование транскриптомов тканей коры головного мозга мышей с нокаутом гена Neat1 и выявлены группы генов, экспрессия и сплайсинг которых изменяются при отсутствии Neat1. В результате был сделан вывод о том, что нарушение функции Neat1 может быть одной из причин возникновения ряда НДЗ и сопровождающих некоторые из них психических расстройств.

В диссертационной работе была также охарактеризована роль другого БАС-ассоциированного белка – CREST – в формировании рибонуклеопротеиновых

комплексов. В частности, было показано, что накопление CREST в клетках приводит к его агрегации и вовлечению в образование параспеклов в ядре и стресс-гранул в цитоплазме клеток. Особое значение имеют оригинальные данные диссертанта, свидетельствующие о том, что агрегация CREST приводит к нарушению формирования параспеклов.

Научно-практическая значимость полученных результатов. Данные, полученные в проведенном исследовании, создают основу для формирования новых представлений о патогенезе БАС и родственных заболеваний. В качестве общего механизма развития заболевания рассматривается нарушение функционирования рибонуклеопротеиновых комплексов, локализующихся в ядре и цитоплазме клеток, главными функциями которых является регуляция активности синтетического аппарата клетки и адаптация к стрессовым условиям. Изучение конкретных метаболических путей и молекулярных участников патологических процессов помогает не только расширить представления о развитии и прогрессировании заболевания, но также выявить новые мишени для лекарственных средств.

Помимо белков, участвующих в образовании рибонуклеопротеиновых комплексов, в работе раскрывается значение длинной некодирующей РНК Neat1, которая непосредственно принимает участие в их сборке. В случае параспеклов длинная некодирующая РНК Neat1 также способна опосредовано через взаимодействие с белками, регулировать работу других рибонуклеопротеиновых комплексов. Функции длинных некодирующих РНК мало изучены, поэтому данные о влиянии Neat1 на возбудимость нервных клеток, а также поведенческие реакции на уровне целого организма важны как с точки зрения фундаментальных аспектов клеточной биологии, так и для разработки новых методов воздействия на функционирование клеток, тканей и систем органов, в частности нервной системы, в норме и при патологии.

Структура и содержание работы. Диссертационная работа построена по классическому плану и состоит из введения, обзора данных литературы, описания материалов и методов исследования, совмещенных результатов и обсуждения, заключения, выводов и библиографического списка литературы, включающего 781 источника. Работа изложена на 311 страницах, содержит 5 таблиц и 65 рисунков.

Во введении автор обосновывает актуальность научной проблематики исследования, определяет цель и задачи. Раздел «Обзор литературы» подробно описывает современные представления о роли различных белков и

рибонуклеопротеиновых комплексов в развитии БАС. Также рассматриваются современные подходы к терапии данного заболевания, основываясь на имеющихся знаниях механизмов патогенеза. При подготовке обзора был проведен исчерпывающий анализ литературы, включающей работы двух последних лет.

В разделе «Материалы и методы исследования» описан широкий круг методов – от оценки экспрессии генов до поведения, которые были использованы для решения поставленных задач. Так, представлены методы культивирования клеток и самые современные молекулярно-генетические подходы к модификации экспрессии целевых генов (нокдаун, трансфекция). Для анализа экспрессии генов использовали количественной ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-кПЦР), а для анализа белков – иммуноблотинг. Уровень экспрессии *Neat1* и образующихся на ее основе параспеклов изучали с помощью *in situ* гибридизации. Для характеристики нокаутной по *Neat1* линии животных использовался широкий набор методов тестирования поведения, а также морфологического и биохимического анализа. Для оценки дифференциально экспрессирующихся генов в коре головного мозга у нокаутных животных проводили секвенирование РНК с последующим биоинформатическим анализом полученных данных. В работе был использован клинический материал группы пациентов с разными формами БАС, проведен гистологический анализ методом *in situ* гибридизации и оценка экспрессии методом ОТ-кПЦР. Протоколы экспериментов изложены четко и подробно.

Раздел «Результаты и обсуждение» структурирован в соответствии с поставленными задачами. В первой части представлены данные по выявлению параспеклов в спинном мозге у пациентов с БАС, а также охарактеризованы потенциальные механизмы, объясняющие причины, вызывающие активацию сборки параспеклов при развитии патологии, при этом главная роль отводится нарушению функций белка TDP-43. Связь TDP-43 с БАС хорошо известна, агрегаты этого белка обнаруживаются в спинном мозге у большинства пациентов. Однако механизмы специфического повреждения двигательных нейронов при БАС, развивающимся при TDP-43-протеинопатии, во многом оставались не ясными. В диссертационной работе приведены убедительные экспериментальные доказательства того, что одним из таких механизмов, запускающих нейродегенерацию, является нарушение биогенеза микроРНК и активация интерферонов I типа.

Во второй части раздела Результаты и обсуждение приводятся подробные данные поведенческого, патоморфологического и биохимического анализа нервной

системы у нокаутных по Neat1 мышей. Этот анализ показал, что при нарушении функции Neat1 развиваются психические отклонения, связанные прежде всего с ответом на стрессовые условия, в основе которых, по-видимому, лежит изменение функционирования нейронов. Эти данные представляют большой интерес, прежде всего потому, что доказывают возможность развития целого комплекса симптомов, характерных для нейродегенеративных и психических заболеваний в результате нарушения функций длинной некодирующей РНК Neat1. Изучение механизмов функционирования Neat1 и ее участия в ответе на стресс позволяет пролить свет на фундаментальные аспекты роли днРНК в функционировании нейронов, что является актуальной задачей современной нейробиологии.

Третий раздел Результаты и обсуждения посвящен характеристике другого БАС-ассоциированного белка - CREST. Его связь с БАС была обнаружена при поиске генетических ассоциаций и в процессе изучения механизмов его патогенного действия, что до последнего времени было крайне скупо представлено в литературе. В диссертационной работе автор показал, что этот белок крайне склонен к агрегации и в агрегированном состоянии оказывает токсическое действие на нейроны. Кроме того, было показано, что CREST входит в состав стресс-гранул и влияет на образование параспеклов, что еще раз указывает на участие рибонуклеопротеиновых комплексов в патогенезе БАС.

Характеризуя диссертационное исследование, следует отметить, что экспериментальный материал и его обсуждение изложены логично и последовательно. Работа написана в хорошем научном стиле в соответствии с принятыми стандартами, если не считать объединение результатов и обсуждения в одну главу. Содержание автореферата соответствует тексту диссертации и опубликованным по теме научным публикациям автора. Материалы диссертации были доложены на международных и российских конференциях, опубликованы в изданиях, рекомендованных ВАК.

Обоснованность и достоверность научных положений и выводов. Диссертационная работа выполнена с использованием широкого круга подходов и современных методов. Все методы применены грамотно и позволяют решать поставленные научные задачи. Было использовано достаточное количество наблюдений, экспериментальных реплик, а также животных в группах. Проанализированный объем патологического и экспериментального материалов является достаточным для получения достоверных научных результатов. Статистическая обработка данных проведена корректно с использованием богатого арсенала методов, что не позволяет сомневаться в

правильности сделанных заключений. Выводы работы прямо вытекают из проведенных автором исследований, согласуются с общемировыми результатами по данной тематике и в значительной степени их дополняют.

По теме диссертации опубликовано 23 научные статьи, в том числе в зарубежных рецензируемых научных изданиях, индексируемых в международных реферативных базах данных Scopus и Web of Science, 14 тезисов докладов научных конференций.

Диссертационная работа М.С. Кухарского не вызывает серьезной критики, однако представляет широкие возможности для научной полемики в рамках процедуры защиты диссертации по ряду вопросов, носящих общий или частный характер.

1. Позволяют ли результаты, полученные в литературе и самим диссертантом, судить о механизмах патогенеза БАС не только на клинической, но и на доклинической стадии БАС. Что известно о факторах, которые могут быть потенциальными триггерами этого заболевания;
2. Какие выявленные диссертантом молекулярные механизмы БАС можно считать наиболее перспективными мишенями для разработки доклинической диагностики и усовершенствования дифференциальной диагностики БАС, а также для создания превентивной терапии и усовершенствования существующей симптоматической терапии;
3. Учитывая то, что, с одной стороны, диссертантом обнаружена протеинопатия, вызывающая гибель клеток, не только в нейронах, но и в глии, а, с другой стороны, общепринято, что нейродегенеративные заболевания сопровождаются или даже запускаются нейровоспалением с активным участием глиальных клеток (астроциты, микроглия), желательно уточнить, какова, по мнению диссертанта, роль глии в патогенезе БАС.
4. Желательно уточнить, каков механизм антиапоптотического действия параспеклов, описанного в диссертации.

Заключение. Диссертационная работа Кухарского Михаила Сергеевича «Нарушение функций рибонуклеопротеиновых комплексов в патогенезе бокового амиотрофического склероза» посвящена актуальной теме, выполнена на высоком методическом уровне и содержит новые данные, имеющие большое теоретическое и практическое значение. Диссертация 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 и усовершенствования существующих методов лечения.

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.

Отзыв обсужден и утвержден на заседании лаборатории нервных и нейроэндокринных регуляций Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, протокол № 5 от 12 августа 2021 г.

Заведующий лабораторией нервных и нейроэндокринных регуляций

ФГБУН Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН.

доктор биологических наук, профессор, академик РАН



/ Угрюмов Михаил Вениаминович

Подпись, профессора Угрюмова М.В. заверяю:



Уполномоченный секретарь Кухарев М.Ю.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН. 119334 г. Москва, ул. Вавилова 26, тел: +7 (499) 135-33-22, адрес электронной почты: info@idbras.ru, официальный сайт: www.idbras.ru.