

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(МИНОБРНАУКИ РОССИИ)

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение

“Научно-исследовательский институт
нейронаук и медицины”

(НИИНМ)

630117, Новосибирск, ул. Тимакова, 4

Тел.: (383) 335-98-55, E-mail: inm@neuronm.ru, www.neuronm.ru

ОКПО 01898500, ОГРН 1025403649831, ИНН 5408106370, КПП 540801001

29.02.2024 № 33-07/44

УТВЕРЖДАЮ

Директор НИИНМ

д.м.н., профессор,

академик РАН

Л.И. Афтанас

«29» февраля 2024 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

о научно-практической ценности диссертационной работы Шуваева Антона Николаевича на тему «Клеточные и молекулярные механизмы развития полиглутаминовых атаксий и патогенетические принципы их коррекции», представленной на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальностям: 3.3.3. – патологическая физиология, 1.5.22. – клеточная биология

Актуальность темы диссертационной работы

Диссертация Шуваева Антона Николаевича посвящена проблеме, актуальной для медицинских и биологических дисциплин: патофизиологии, нейробиологии, неврологии – изучению патологических механизмов возникновения и развития полиглутаминовых атаксий, а также терапевтическим способам их коррекции.

Полиглутаминовые атаксии являются тяжёлыми нейродегенеративными заболеваниями. Уже с ранней стадии заболевания в патологический процесс вовлекается мозжечок, и развивается атаксия. Со временем начинают погибать структуры ствола мозга, задействованные в процессах дыхания и глотания, что является непосредственной причиной смерти таких пациентов. Современные работы по изучению полиглутаминовых атаксий единичны и посвящены изучению отдельных нозологий, что не позволяет интегрировать данные и разработать общие патогенетические терапевтические подходы к лечению этих состояний.

В настоящее время накоплен большой материал о морфологии и нормальной функции структур мозжечка, его вклад в моторное обучение. Однако существует недостаток знаний о поэтапном дегенеративном процессе нейронов коры мозжечка, его компенсаторных возможностях в неблагоприятных условиях и отклик на терапевтические агенты. Поэтому существенный интерес представляет исследование общих и частных патогенетических механизмов, участвующих в нейродегенерации мозжечка. Актуальность также вызвана отсутствием не только патогенетического лечения, но и какой-либо терапии улучшающей качество жизни и увеличивающей её продолжительность у больных с полиглутаминовыми атаксиями. Следует также отметить, что в России находится самый большой очаг заболеваемости спиноцеребеллярной атаксией 1 типа (СЦА1) у коренного населения Якутии, что обуславливает актуальность и значимость проведенного исследования для отечественного здравоохранения.

Научная новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Выполненная работа является комплексным нейробиологическим и морфологическим исследованием, которое позволило всесторонне изучить организацию коры мозжечка на ранних и продвинутых стадиях патологического процесса при полиглутаминовых атаксиях. Для этой цели впервые были созданы шесть векторных и фармакологических моделей с

воздействием на разные типы клеток коры мозжечка. При сравнении трансгенных моделей патологии мозжечка, в частности, полиглутаминовой модели и мышей линии «Staggerer», впервые была показана деградация фактора транскрипции RoR α как общее звено полиглутаминовых атаксий. Также впервые был исследован mGluR1-зависимый путь передачи сигналов в моделях полиглутаминовых атаксий, а также связанные с его нарушением, изменения кратковременной и долговременной синаптической пластичности в синапсах коры мозжечка. Принципиально новыми являются данные по воздействию на изученные звенья патогенеза полиглутаминовых атаксий с целью уменьшения нейродегенеративного процесса и коррекции атаксического фенотипа модельных мышей. Для этого были применены генная терапия, введение стволовых клеток, а также фармакологических препаратов, уже используемых в неврологической практике, таких как мемантин и баклофен.

Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.

Диссертационная работа Шуваева Антона Николаевича выполнена на высоком современном научно-методическом уровне с применением высокоинформативных электрофизиологических, поведенческих, иммуногистохимических методов и на материале, достаточном для получения аргументированных положений, выявления и установления общих закономерностей при полиглутамновых атаксиях. Сформулированные в диссертации научные положения и выводы обоснованы теоретически и логически вытекают из основных положений диссертации. Выводы полностью соответствуют поставленным цели и задачам и опираются на полученные экспериментальные данные. Достоверность полученных результатов определена при статистической обработке в соответствии с принципами биомедицинской статистики. Анализ полученных в исследовании данных в сравнении с материалами из литературных

источников отечественных и зарубежных авторов позволяет считать результаты и выводы, представленные в работе, убедительными и обоснованными. Материалы диссертационного исследования в необходимом объеме представлены в публикациях в рецензируемых отечественных и зарубежных журналах. Полученные результаты были обсуждены на конференциях всероссийского и международного уровня.

Научная и практическая значимость полученных результатов

Диссертационная работа Шуваева Антона Николаевича имеет большое теоретическое и практическое значение, так как в результате исследований были получены данные, свидетельствующие о патогенетической общности полиглутаминовых атаксий. Выявленные нарушения на клеточном и субклеточном уровнях существенно расширяют современные представления о возникновении и развитии полиглутаминовых атаксий. Выявление общих патогенетических механизмов – это важный этап в разработке универсальной терапии данных состояний. Автор успешно применил разные терапевтические подходы в коррекции атаксического синдрома на моделях нейродегенерации мозжечка.

Полученные результаты определяют направление дальнейших исследований, как клинических, так и на моделях у животных. Фармакотерапевтический подход в среднесрочной перспективе быть может взят за основу для внедрения в клинику при терапии полиглутаминовых заболеваний. Разработанные модели могут использоваться для преclinical оценки разрабатываемых средств и подходов в терапии нейродегенеративных заболеваний мозжечка.

Теоретические положения исследования могут быть использованы в курсах лекций и учебных пособиях для студентов биологических и медицинских факультетов ВУЗов.

Оценка содержания диссертации и ее оформления

Диссертация изложена на 346 страницах машинописного текста и

состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, обсуждения результатов, заключения и выводов, после чего следует список использованной литературы. Диссертация хорошо иллюстрирована, содержит 19 таблиц и 115 рисунков. Работа хорошо структурирована, название темы диссертации соответствует поставленной цели и задачам исследования. Список использованной литературы содержит ссылки на 527 источников.

Во **введении** обоснована актуальность данного исследования, описана разработанность темы, поставлены цель и задачи работы. Также отражена научная новизна и научно-практическая значимость исследования.

В **первой** главе «Обзор литературы» представлен критический анализ существующих представлений о патогенезе и развитии полиглутаминовых атаксий, их распространенности, рассмотрены имеющиеся экспериментальные терапевтические подходы, их недостатки и преимущества. Автором проанализирован большой объём литературы с учётом современных данных по изучаемой проблеме. Обзор написан хорошим литературным языком и является полным источником информации по изучаемой проблеме. Проведенный анализ литературных данных актуализирует проблему. Антону Николаевичу удалось квалифицированно и четко выделить пробелы в знаниях о патогенезе и возможностях коррекции симптомов полиглутаминовых атаксий, что послужило научным обоснованием проведения собственного исследования.

Во **второй** главе «Материалы и методы исследования» описаны модели на животных, создание и получение векторных конструкций. Подробно описаны электрофизиологические методы как центральный подход выполненной работы. С другой стороны, представлены иммуногистохимический анализ, молекулярно-генетические методы, вестер-блот, Ca^{2+} имиджинг, поведенческие тесты, которые дополняют и уточняют данные, полученные с помощью электрофизиологических методов.

Результаты исследований описаны в **третьей** главе. В первой её части приводятся результаты, демонстрирующие патогенетическое сродство полиглутаминовых атаксий. Данные представлены в большом объёме на 9 моделях, описывающих различные звенья патогенеза полиглутаминовых атаксий. Отдельно следует отметить большое количество качественных иллюстраций. Во второй части третьей главы приводятся данные различных подходов по коррекции звеньев патогенеза полиглутаминовых атаксий и уменьшению атаксического синдрома у модельных животных.

В **четвертой** главе «Обсуждение результатов исследования» и в заключении автор анализирует собственные данные, проводит интерпретацию и сопоставление с результатами других исследований. Данные, полученные в результате изучения структурной и функциональной организации коры мозжечка при полиглутаминовых атаксиях, обобщены и дополнены новыми молекулами-мишенями, критичными для появления атаксического синдрома и нейродегенерации клеток Пуркинью мозжечка, включая такие молекулы как mGluR1, EAAT1, Rora α и др. На основании проведенных исследований сформулировано 7 выводов, которые соответствуют поставленным задачам.

Работа изложена грамотно, оформлена соответственно требованиям, предъявляемым к научным работам, представленным на соискание ученой степени доктора наук. **Автореферат** диссертации в полной мере отражает ее содержание.

Материалы диссертации опубликованы в 17 научных работах, входящих в перечень ВАК. Результаты диссертационной работы доложены и обсуждены на отечественных и международных научных конференциях, конгрессах, съездах, симпозиумах.

Тема и содержание диссертационного исследования соответствует паспортам специальностей 3.3.3. – патологическая физиология (пп. 2, 4, 8, 11) и 1.5.22. – клеточная биология (пп. 8, 12, 13, 15, 22, 23).

Замечания и вопросы по диссертационной работе

В ходе прочтения диссертации возникли следующие замечания и вопросы дискуссионного характера.

Замечания:

1) Из описания метода определения экспрессии генов по уровням мРНК не понятно, как проводили ПЦР, с использованием зондов, красителей, или, может, просто электрофорез для детекции продукта? Для нормирования экспрессии целевых генов использовали всего один ген сравнения (GAPDH). В приведенной последовательности обратного праймера для гена *Vegf* присутствует опечатка в двух нуклеотидах на 3'-конце.

2) В методах нет описания иммуногистохимического анализа белков GFP, CRAG, IBA1.

3) Отвлекают внимание при чтении результатов ссылки на собственные публикации (408, 409, 450,455, 467, 470,473,481 500 и др), которые указаны в списке публикаций автора в автореферате.

4) В тексте много сокращений, расшифровка ряда из них не приводится (например, ChR2, HA). Присутствуют опечатки, жаргонизм (например, в выводе 5 – «полиглутаминовым животным»). Название генов следует писать курсивом; гены лабораторных грызунов пишут с первой заглавной буквы и остальными строчными; вместо мРНК - мРНК; вместо RT-ПЦР - ПЦР-РВ или RT-PCR или qPCR.

Вопросы:

1) Какое отношение имеет память о страхе к симптомам полиглутаминовых спиноцеребеллярных атаксий? Есть ли результаты теста условнорефлекторного замирания (Fear conditioning) на других линиях мышей?

2) Каковы механизмы, связывающие блокаду NMDA рецепторов (с помощью мемантина) с повышением экспрессии транспортера EAAT1 в астроцитах?

Вышеизложенные замечания и вопросы не являются существенными и

не снижают значимости проведенного исследования. Принципиальных замечаний к содержанию и оформлению диссертационной работы нет.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Шуваева Антона Николаевича на тему «Клеточные и молекулярные механизмы развития полиглутаминовых атаксий и патогенетические принципы их коррекции», представленная на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальностям 3.3.3. – патологическая физиология и 1.5.22. – клеточная биология, является законченной, самостоятельно выполненной научно-квалификационной работой, посвященной актуальной теме, результаты которой можно квалифицировать как научное достижение, имеющее существенное значение для патологической физиологии и клеточной биологии, расширяющее представление о патологических процессах в мозжечке в условиях нейродегенерации, а также терапевтических методах, воздействующих на эти процессы.

Диссертационная работа Шуваева Антона Николаевича по актуальности, полноте изложения, научной новизне, объёму выполненных исследований, теоретической и практической значимости полученных результатов, обоснованности выводов соответствует требованиям пп. 9 и 14 «Положения о порядке присуждения учёных степеней», утверждённого постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г., № 842 (в редакции от 01.10.2018 г. № 1168), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора медицинских наук, а её автор, Шуваев Антон Николаевич, заслуживает присуждения ученой степени доктора медицинских наук по специальностям: 3.3.3. – патологическая физиология, 1.5.22. – клеточная биология.

Отзыв на диссертационную работу Шуваева Антона Николаевича на тему «Клеточные и молекулярные механизмы развития полиглутаминовых атаксий и патогенетические принципы их коррекции» обсужден и одобрен на

заседании Отдела экспериментальной нейронауки Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины» – Протокол № 1, от 14 февраля 2024 г.

Главный научный сотрудник, заведующая лабораторией нейробиологических механизмов нейродегенеративных процессов Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины», доктор биологических наук

Тихонова М.А.

Главный научный сотрудник, заведующая Отделом экспериментальной нейронауки, заведующая лабораторией экспериментальных моделей нейропсихиатрических нарушений, заместитель директора по научной работе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины», доктор биологических наук, доцент

Амстиславская Т.Г.

дата 28.02.2024

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины».

630117, Российская Федерация, г. Новосибирск, ул. Тимакова, д.4. (383) 335-98-55. inm@neuronm.ru

Подписи д.б.н. М.А. Тихоновой и д.б.н., доцента Т.Г. Амстиславской заверяю:

Ученый секретарь Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины», к.б.н.



Жанаева С.Я.

Подписи Тихоновой М.А., Амстиславской Т.Г., Жанаевой С.Я. заверяю.
Вице-президент по кадрам А.А. Петрова 28.02.2024