

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора биологических наук, Зайцева Алексея Васильевича на диссертационную работу Шуваева Антона Николаевича на тему: «Клеточные и молекулярные механизмы развития полиглутаминовых атаксий и патогенетические принципы их коррекции», представленную на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальностям: 3.3.3. – патологическая физиология, 1.5.22. – клеточная биология

Актуальность темы диссертационного исследования и ее связь с практическими проблемами здравоохранения

Нейродегенеративные заболевания – тяжелые медленно прогрессирующие расстройства, приводящие к деменции и/или двигательным расстройствам, являются предметом изучения многих нейробиологов и клиницистов. При этом наследственным полиглутаминовым атаксиям (спиноцеребеллярным атаксиям, СЦА), вызывающим нейродегенерацию мозжечка, уделяется незаслуженно мало внимания. Однако это актуальная проблема, особенно в Российской Федерации, так в ряде сибирских регионов распространённость этих заболеваний достаточно высока.

На сегодняшний день не существует патогенетического лечения, улучшающего качество жизни и увеличивающего её продолжительность у больных с полиглутаминовыми заболеваниями. Поэтому изучение звеньев патогенеза СЦА и поиск методов коррекции является сложной и важной задачей. В работе А.Н. Шуваева особое внимание уделено нарушениям, происходящим на ранней стадии заболевания, когда имеют место скорее функциональные, чем морфологические изменения. Эти изменения носят обратимый характер, поэтому рационально проводить терапию на этой стадии, и именно в этой фазе заболевания проведены большинство исследований диссертации.

Степень обоснованности и достоверности научных результатов

Выносимые на защиту положения и выводы базируются на анализе совокупности полученных результатов, лаконично сформулированы, конкретны. Они весомы, обоснованы собственными в ряде случаев уникальными материалами, полученными с помощью комплекса современных нейрофизиологических, биофизических, биохимических, гистологических, молекулярно-биологических методов исследований. Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации обеспечена профессиональным анализом литературы, умением

формулировать цели и задачи исследований, мультидисциплинарным подходом с использованием комплекса взаимодополняющих современных методов исследований, а также адекватной статистической обработкой данных.

Результаты и основные положения были апробированы на нескольких международных симпозиумах и конференциях: 35-й ежегодной конференции японского общества Нейронаук, г. Ниагоя, 2012; 36-й ежегодной конференции японского общества Нейронаук «Neuroscience 2013», г. Киото; 5-й ежегодной конференции международного общества радиационной нейробиологии, г. Такасаки, 2013; «Russia-Japan medical symposium», г. Красноярск, 2018 г.; «II Всероссийской научной конференции с международным участием «ОПТОГЕНЕТИКА+ 2018», г. Санкт-Петербург, 2020г; научной конференции с международным участием «Разработка лекарственных средств - традиции и перспективы», г. Томск 2021г

Результаты диссертации прошли квалифицированную внешнюю экспертизу и были опубликованы в ведущих международных журналах, таких как *Cerebellum*, *J. Physiol.*, *Neurobiology of Disease*, *Int. J. Mol. Sci.*, *Cells*, *Reviews in the Neurosciences*. Публикации в таких высокорейтинговых профессиональных журналах свидетельствуют о принципиальной научной новизне и значимости полученных результатов. В целом, результаты диссертационного исследования отражены в 17 научных изданиях, которые включены в перечень российских рецензируемых научных журналов и изданий для опубликования основных результатов научной работы.

Полученные автором диссертации собственные данные являются убедительными, приоритетными, несут фундаментальный характер, расширяют современные представления о механизмах СЦА и предлагают новые подходы к лечению.

Научная новизна, теоретическое и научно-практическое значение диссертационного исследования

Диссертант ставит перед собой цель найти ключевые патологические проявления и скорректировать их, используя модели полиглутаминовых атаксий на животных. Одним из основных обратимых изменений в клетках Пуркинье при полиглутаминовых атаксиях являются нарушения кратковременной и долговременной синаптической пластичности. Нарушение клеточных и молекулярных механизмов пластичности ведет к плохим результатам обучения моторным навыкам модельных животных и развитию у них атаксического синдрома. Автор убедительно показывает в работе, что синаптическая

пластичность может быть восстановлена на ранних стадиях заболевания с помощью различных терапевтических подходов, таких как генная терапия, введение стволовых клеток и фармакотерапия. Подобная цель и вытекающие из нее задачи исследования определяют актуальность исследования и новизну полученных результатов.

Впервые были созданы векторные модели с селективной экспрессией мутантного атаксина 1 в разных типах клеток коры мозжечка. Селективное поражение клеток Пуркинье или специализированных астроцитов – глии Бергмана позволило детально изучить патологию трёхкомпонентного синапса при полиглутаминовых заболеваниях. Эти данные были соотнесены с «классическими» трансгенными моделями СЦА1 и другими моделями нейродегенерации мозжечка. В частности, при сравнении моделей *staggerer*, универсальной полиглутаминовой и СЦА1, впервые было показано уменьшение экспрессии регулятора транскрипции *Rora* и замедление экспрессии витальных белков, как универсальный процесс в патогенезе полиглутаминовых атаксий. С помощью электрофизиологических методов исследования был впервые оценён эффект от недостаточности *mGluR1* в моделях полиглутаминовых атаксий и более подробно в моделях СЦА1. Впервые было показано восстановление кратковременная и долговременная синаптической пластичности при применении генной терапии, фармакотерапии и после введения стволовых клеток в кору мозжечка данным животным.

Теоретическая значимость диссертационной работы заключается в открытии и описании новых общих и частных звеньев патогенеза полиглутаминовых атаксий, в особенности СЦА1. Разделение автором всех эффектов на приобретение токсических и потерю нормальных функций мутантных полиглутаминовых белков позволило детально описать молекулярные процессы, происходящие на субклеточном уровне в нейронах коры мозжечка при их дегенерации. Такое положение тесным образом связано с проведёнными автором исследованиями, опубликованными в его работах.

Данные нарушения на субклеточном уровне автор смог экспериментально связать с клеточными и межклеточными нарушениями, такими как нарушение возбудимости клеток Пуркинье и подавление синаптической пластичности, а также с развитием атаксии у модельных животных. Более того, на практике автор показал, что данные нарушения обратимы и могут уменьшаться после применения таких терапевтических подходов, как генная терапия, введение стволовых клеток и фармакотерапия. Данные эксперименты могут быть взяты за основу для внедрения в клинику при терапии полиглутаминовых заболеваний.

Выводы и практические рекомендации обоснованы и важны для теоретической

науки. Результаты диссертационной работы внедрены в научный процесс НИИ молекулярной медицины и патобиохимии «Красноярского медицинского университета имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Результаты диссертационного исследования могут быть использованы в нейробиологических лабораториях для изучения дегенеративного процесса не только мозжечка, но и ствола и большого мозга. К примеру, использование астроцит-опосредованных моделей дегенерации может дополнить картину патологических изменений такой распространённой патологии, как болезнь Альцгеймера. Нарботки по коррекции нейродегенерации мозжечка имеют потенциал внедрения в клинику после проведения доклинических исследований.

Оценка содержания диссертации и ее оформления

Диссертация изложена на 346 страницах, главы логично связаны с друг с другом, материал иллюстрирован большим количеством таблиц и рисунков. Всего в диссертации 19 таблиц и 115 рисунков, название темы диссертации соответствует поставленной цели и задачам исследования. Список литературы содержит 527 источников.

Во **введении** раскрыта актуальность исследуемой темы, новизна и научно-практическая значимость исследования, сформулированы цель и задачи исследования, есть данные о реализации и апробации материалов диссертации, содержатся сведения о структуре диссертационной работы и об основных публикациях диссертанта.

В **первой главе** представлен обзор литературы по теме исследования. Литературный обзор заслуживает самой высокой оценки. Он очень хорошо структурирован, написан ясно, хорошо иллюстрирован, основан на анализе современной научной литературы и в достаточной степени знакомит читателя с основными вопросами диссертационного исследования. Описана эпидемиология и распространённость полиглутаминовых атаксий, их виды и особенности. Автор описал патологию данных состояний на субклеточном и клеточном уровне, описал межклеточные взаимодействия с точки зрения трёхкомпонентного синапса. Последняя часть этой главы посвящена современным терапевтическим подходам к лечению полиглутаминовых атаксий.

Вторая глава посвящена методам исследования: автор в своей работе использует такие методы, как метод локальной фиксации потенциала, вестерн-блот, исследование поведения животных, а также иммуногистохимические, генетические и статистические

методы. Хотя автор описывает основные методические приемы, многие детали вычислений и оценки мембранных свойств, характеристик синаптической пластичности не описаны, что затрудняет понимание ряда результатов.

В **третьей главе** описаны полученные данные. Выделяется большое количество моделей животных, которые описывают определённое звено патогенеза. Поэтому автору удалось сравнить основные клеточные и субклеточные нарушения и выявить общие звенья патогенеза полиглутаминовых атаксий. К таким изменениям можно отнести нарушение экспрессии фактора транскрипции Rora , количественное уменьшение mGluR1 на шипиках клеток Пуркинье и замедление обратного захвата глутамата астроцитами в синапсах коры мозжечка. Данные изменения были взяты за основу сравнения с модельными животными нейродегенерации мозжечка, получавших ту или иную терапию.

Четвёртая глава состоит из обсуждения результатов. Обсуждения отражают важнейшие патогенетические механизмы развития нейродегенерации мозжечка при полиглутаминовых атаксиях и отражены в виде схем-рисунков.

Диссертация завершается **7 выводами**.

Обоснованность и достоверность научных положений и выводов

Все исследования, описанные в работе, проводились согласно выдвинутой гипотезе о наличии общих звеньев патогенеза у полиглутаминовых атаксий, на которые можно повлиять схожими терапевтическими агентами. Поэтому научные положения и выводы выглядят обоснованными. В работе использовано большое количество методов, которые подтверждают полученные результаты. Основным методом в работе является метод локальной фиксации потенциала, который является «золотым» стандартом в нейрофизиологических исследованиях. Автор исследует особенности пассивных мембранных свойств, синаптические ответы, а также кратковременную и долговременную синаптическую пластичность. Электрофизиологические методы дополняют иммуногистохимический метод и вестерн-блот, которые показывают количество и локализацию белков-мишеней в поражённой клетке. В связи с этим, полученные данные имеют высокий уровень достоверности.

Личный вклад диссертанта и наиболее значимые результаты

Автор лично принимал непосредственное участие в экспериментах, их разработке, а также анализе полученных данных. Наиболее значимым результатом является выявление общих для всех полиглутаминовых атаксий обратимых звеньев патогенеза и доказательство

возможности их коррекции с помощью различных терапевтических средств. Промежуточные результаты были неоднократно доложены на конференциях и симпозиумах. Исследования под руководством Шуваева А.Н. получили финансовую поддержку такими научными фондами, как РФФИ и РНФ.

Достоинства и недостатки по содержанию и оформлению диссертации

Достоинствами диссертационной работы Шуваева А.Н. является охват и обработка большого массива данных, сочетание различных методов, которые напрямую или косвенно показывают общие звенья патогенеза полиглутаминовых атаксий. Также представлен широкий спектр терапевтических подходов от генной терапии до фармакотерапии данных состояний.

К представленной диссертации у рецензента нет принципиальных замечаний, так как она выполнена на очень высоком профессиональном уровне и заслуживает самой высокой оценки. Однако при прочтении возникло несколько замечаний и вопросов, которые хотел бы предложить для обсуждения.

- 1) При анализе пассивных мембранных свойств клеток Пуркинье автор среди прочих перечисляет сопротивление доступа (стр. 101). Сопротивление доступа не является характеристикой мембранных свойств, а отражает качество патча. Его обычно приводят, чтобы показать схожесть экспериментальных условий, стабильность патча. В то же время автор не приводит мембранную константу (постоянную времени), что обычно принято делать, так как позволяет лучше понять особенности суммации мембранных ответов.
- 2) При сравнении различных моделей и описании свойств клеток Пуркинье автор практически не описывает свойства потенциалов действия, паттернов разрядов, частотно-токовые характеристики. Учитывая, что активные мембранные свойства сильно зависят от морфологии нейрона, а при нейродегенеративных заболеваниях морфология нейронов меняется, можно ожидать, что эти свойства существенно меняются. Информация о этих характеристиках нейронов была бы очень полезна, так как позволяет понять особенности работы нейронных сетей и механизмы их нарушений. Могут ли активные мембранные свойства использоваться в качестве индикатора
- 3) Оформление таблиц и рисунков. Довольно часто потеряны единицы измерения или даны ошибочно (например, таблица 6, кинетические свойства синаптических

ответов без единиц измерения, рис. 10, по оси абсцисс указаны минуты, а должны быть, вероятно, секунды).

- 4) В ряде случаев, на взгляд рецензента, не хватает контрольных экспериментов. Например, в разделе 3.1.1.2. при анализе нарушений кратковременной синаптической пластичности делается вывод о mGluR1-зависимом механизме. Однако автор не использует соответствующий антагонист/агонист, чтобы фармакологически доказать это. В разделе 3.1.2.2 аналогичное замечание: так медленные токи теоретически могут иметь иную природу, то использование антагонистов к mGluR1, TRPC3 позволило бы доказать это. При оценке нарушений долговременной синаптической депрессии кроме вклада mGluR, можно было проверить вклад NMDA-рецепторов, так как ранее он был показан в данном типе синапсов (Casado M, Isope P, Ascher P (2002) Involvement of presynaptic N-methyl-D-aspartate receptors in cerebellar long-term depression. *Neuron* 33(1): 123–30.)
- 5) При сравнении свойств вызванных синаптических ответов автор использует абсолютные значения амплитуд (рис. 102). Насколько это обосновано, ведь амплитуда зависит от силы стимуляции, особенностей порезки срезов, их сохранности. Как проводилась стандартизация результатов?
- 6) Изучение NMDA-токов в клетках Пуркинье. Рис. 96 и 97. Легенда и цвета на самих графиках, а также тест частично не совпадают, из-за чего логика изложения не совсем понятна. Вывод о внесинаптическом расположении NMDA-рецепторов у клеток Пуркинье поэтому кажется доказанных не полностью.
- 7) Применение мемантина. Почему была выбрана доза 30 мг/кг? Она представляется избыточной, так как в большинстве моделей используют дозу 5 мг/кг. Возможно, что в этом случае побочные эффекты лечения мемантином были бы слабее.

Заключение. Таким образом, диссертационная работа Шуваева Антона Николаевича «Клеточные и молекулярные механизмы развития полиглутаминовых атаксий и патогенетические принципы их коррекции», представленная на соискание ученой степени доктора медицинских наук, является завершенной научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований разработаны теоретические положения и практические рекомендации, совокупность которых можно квалифицировать

как научное достижение в виде разработки потенциальных методов терапии полиглутаминовых атаксий, имеющее важное теоретическое и социально-экономическое значение, что соответствует требованиям п. 9 Положения о порядке присуждения учёных степеней, утверждённого постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г., № 842 (с изменениями в редакции постановлений Российской Федерации от 28.08.2017 г. № 1024.), 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.

Официальный оппонент по диссертации:
главный научный сотрудник лабораторией
молекулярных механизмов нейронных взаимодействий
Федерального государственного бюджетного
учреждения науки Института эволюционной
физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова
Российской академии наук,
доктор биологических наук



Алексей Васильевич Зайцев

26 февраля 2024 г.

Подпись Зайцева А.В. заверяю.

Ученый секретарь
Федерального государственного бюджетного
учреждения науки
Института эволюционной физиологии и
биохимии им. И.М. Сеченова
Российской академии наук
кандидат биологических наук



Е.И. Гальперина

Адрес: 194223, г. Санкт-Петербург, пр. Тореза, д. 44. Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук. тел.: 8 (812) 552-30-12; e-mail: aleksey_zaitsev@mail.ru