

## ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора биологических наук, профессора Мухиной Ирины Васильевны на диссертационную работу Шуваева Антона Николаевича: «Клеточные и молекулярные механизмы развития полиглутаминовых атаксий и патогенетические принципы их коррекции» по специальностям 3.3.3 – патологическая физиология и 1.5.22 – клеточная биология на соискание ученой степени доктора медицинских наук

### **Актуальность темы выполненной диссертационной работы**

Диссертационная работа Шуваева А.Н. посвящена актуальному вопросу медицины, в частности механизмам развития наследственных нейродегенеративных заболеваний, а именно спиноцеребеллярной атаксии (СЦА). Субстратом полиглутаминовых атаксий является ЦАГ тринуклеотидная последовательность (цитозин-аденин-гуанин), которая имеет тенденцию к увеличению при передаче генома последующим поколениям, наследуются по аутосомно-доминантному механизму. Мутированный белок вступает во взаимодействие с десятками белков-коактиваторов транскрипции, которые в свою очередь, управляют работой десятков факторов транскрипции и, тем самым, осуществляют контроль над сотнями генов-мишеней. Поэтому характерная особенность этих заболеваний – не только количественное увеличение больных, но и качественное изменение течения их неврологической симптоматики, патогенетические аспекты которых остаются не изученными на молекулярном уровне.

Несмотря на малоизученность молекулярных механизмов проявления нейродегенерации при спиноцеребеллярной атаксии разрабатываются различные фармацевтические способы терапии. Методы лечения можно разделить на несколько групп: предотвращение экспрессии мутантного гена, повышение клиренса мутантных белков, снижение токсичности этих белков, влияние на нисходящие пути передачи сигналов, ингибирование транслугтаминаз, дисрегуляция транскрипции, влияние на функцию митохондрий, активация каспаз и влияние на клеточную гибель, влияние на окислительное повреждение и трансплантация. Среди новых методов терапии выделяется использование мезенхимальных стволовых клеток (МСК) для замедления прогрессирования полиглутаминовых спиноцеребеллярных атаксий. Большие надежды связаны с использованием генной терапии. Генотерапевтические подходы могут влиять на различные механизмы развития заболевания, воздействуя на мутантную РНК, аутофагию (деградация компонентов клетки в ее лизосомах) и связанную с убиквитином систему расщепления белков, на метаболические пути, связанные с нейропротекцией, нарушения регуляции транскрипции, расщепление мутантных белков в целом, образование их агрегатов, воспалительные процессы, эксайтотоксичность (повреждение нервных клеток при воздействии нейромедиаторов), связанный с эндоплазматическим ретикуломом стресс, кальциевый гомеостаз, нарушение функционирования митохондрий либо синапсов.

Отсутствие патогенетической терапии и симптоматических препаратов, способных улучшить качество и увеличить продолжительность жизни больных полиглутаминовыми СЦА, свидетельствуют о крайне низкой разработанности темы исследования.

Все эти вопросы легли в основу цели научной работы диссертанта, которая была сформулирована следующим образом: выявление новых клеточных и молекулярных механизмов развития полиглутаминовых атаксий с использованием общих полиглутаминовых и оптогенетических моделей, а также частных моделей спиноцеребеллярной атаксии I типа; разработка на их основе подходов к патогенетической коррекции данных состояний.

В качестве объективных методов, выявляющих молекулярные механизмы нарушения сигнализации в клетках Пуркинье и глии при полиглутаминовых атаксиях на ранней и развёрнутой стадии заболевания, были выбраны современные генетические методы моделирования заболевания, отражающие наиболее важные звенья патогенеза полиглутаминовых атаксий - 9 моделей животных, охватывающих наиболее важные звенья патогенеза полиглутаминовых атаксий, в том числе Созданы модели спиноцеребеллярной атаксии I типа: с отсроченным началом заболевания, максимально приближенная по времени к естественному дебюту у больных и с селективной экспрессией атаксина I в астроцитах мозжечка. Создана оптогенетическая модель астроглиоза I1 мозжечка, описывающая астроцитарное звено патогенеза полиглутаминовых спиноцеребеллярных атаксий

Кроме того, в работе были осуществлены следующие подходы к патогенетическому лечению СЦА1 модельных животных: 1. Таргетная доставка генов: заместительная терапия плохо синтезируемых белков: MSCV-GFP-P2A-mGluR1-WPRE; L7-4mCMV-GFP-P2A-mtTA+TRE-NA-mGluR1 и клиренс агрегированных белков посредством активации белков убиквитин-протеасомной системы: MSCV-GFP-P2A-CRAG; 2. Трансплантация стволовых клеток: мезенхимальные стволовые клетки из костного мозга мыши, линия KUM10 (МСК); 3. Фармакотерапия: воздействие на пути передачи сигналов: баклофен и воздействие на эксайтотоксичность: мемантин.

Работа проведена как на переживающих срезах мозжечка мышей линии CD1, так и *in vivo* на трансгенных мышах. В работе использовались иммуногистохимическое исследование срезов мозжечка, электрофизиологические методы (локальной фиксации потенциала, запись полевых потенциалов) мембраны клеток, тестирование поведения животных с выявлением нарушений функции мозжечка, методы оптогенетики, стереотаксическое введение веществ в кору мозжечка, генетические методы исследования (ПЦР), Ca<sup>2+</sup> имиджинг, фармакологический анализ. Достоверность полученных данных подтверждена методами математической статистики, что позволило автору получить новые данные о молекулярно-клеточных механизмах СЦА1 и патогенетически обосновать таргетное лечение полиглутаминовых спиноцеребеллярных атаксий, которое может быть направлено на коррекцию как нейронного, так и астроцитарного компонента синапса коры мозжечка.

### **Степень обоснованности, достоверности научных результатов**

Научные положения диссертационной работы обоснованы достаточным количеством экспериментальных подходов и разнообразием молекулярно-генетических методов исследования. Положения и выводы диссертационной работы сформулированы на основе полученных результатов и отвечают поставленным задачам, а исследование соответствует паспорту специальности 3.3.3 – патологическая физиология в области изучения механизмов развития заболеваний, типовых патологических процессов и реакций организма на воздействие патогенных факторов, в том числе механизмов формирования патологических систем и нарушений информационного процесса, обуславливающих развитие заболеваний, а также специальности 1.5.22 – клеточная биология в области изучения внутриклеточной сигнализации, межклеточной сигнализации. Рецепторные системы клетки, клеточные технологии как основа для разработки терапевтических подходов для лечения различных патологий

Текст автореферата свидетельствует о высокой квалификации автора и соответствует содержанию диссертационной работы. Замечания в основном касаются орфографических и стилистических ошибок, отсутствия полного списка сокращений, что затрудняет чтение текста, но замечаний к содержанию автореферата, снижающих научную и практическую значимость работы, не выявлено.

Основные результаты диссертации представлены в 15 печатных работах в журналах, индексируемых аналитическими базами Scopus, Web of Science, RSCI, в том числе в журналах, рекомендованных ВАК для публикации материалов диссертаций на соискание ученой степени доктора наук. Статьи полностью отражают результаты диссертационного исследования. Не вызывает сомнений личный вклад автора в планирование, выполнение исследований, обработку материала, анализ и написание статей.

### **Научная новизна, теоретическое и научно-практическое значение диссертационного исследования**

Автором диссертационного исследования вынесены на защиту следующие основные положения: (1) общими звеньями патогенеза полиглутаминовых спиноцеребеллярных атаксий являются стимулированное мутантным атаксином 1 нарушение mGluR1-опосредованного пути передачи сигналов и развитие эксайтотоксичности, что приводит к изменению морфологии клеток Пуркинье и глии Бергмана, а также нарушению синаптической пластичности нейронов коры мозжечка и появлению атаксического синдрома; (2) коррекция нарушенного mGluR1-опосредованного пути передачи сигналов в клетках Пуркинье возможна двумя путями: 1 - поддержание достаточного количества mGluR1 на шипиках дендритов при сохранной морфологии клеток Пуркинье посредством усиления клиренса мутантных белков или введения стволовых клеток в зону нейродегенерации; 2 - перераспределение молекулярной сигнализации с помощью комплекс-образующих с mGluR1 ГАМКв рецепторов; (3) уменьшение явлений эксайтотоксичности в синапсах клеток Пуркинье возможно при длительном введении мемантина животным с оптогенетической неспецифической моделью астроглиоза мозжечка, общей для всех

полиглутаминовых спиноцереbellярных атаксий. Мемантин восстанавливает морфологию глии Бергмана и клеток Пуркинье, а также улучшает транссинаптическую передачу в синапсах коры мозжечка, но на фоне появления тревожности.

Для доказательства данных положений автором были получены следующие новые факты:

- выявлен общий молекулярный механизм нарушения морфологии клеток Пуркинье при полиглутаминовых спиноцереbellярных атаксиях в виде уменьшения экспрессии транскрипционного фактора RoR $\alpha$ ;

- количественно оценён эффект от недостаточности mGluR1 в моделях спиноцереbellярной атаксии 1 типа посредством регистрации и измерения характеристик mGluR1-опосредованных медленных возбуждающих синаптических токов;

- показана зависимость моторного обучения от mGluR1-опосредованной синаптической пластичности, так как у животных с нарушением долговременной депрессии и эндоканнабиноид-опосредованного подавления синаптического возбуждения наблюдалось развитие атаксического фенотипа;

- доказано восстановление mGluR1- опосредованного пути передачи сигналов при экспрессии нейронной ГТФазы CRAG в двух моделях полиглутаминовых спиноцереbellярных атаксий;

- показана эффективная трансплантация мезенхимальных стволовых клеток при их инъекции в подбололочное пространство в области верхних двухолмий трансгенным модельным полиглутаминовым животным, результатам которой явилось восстановление морфологии клеток Пуркинье и mGluR1-опосредованного пути передачи сигналов;

- экспериментально доказано, что однократное введение низких доз баклофена в кору мозжечка трансгенных животных с селективной экспрессией мутантного атаксина 1 в клетках Пуркинье вызывает длительное восстановление mGluR1- опосредованного пути передачи сигналов посредством активации ГАМКв рецепторов и приводит к уменьшению атаксического фенотипа;

- установлено, что долговременный приём мемантина животными с оптогенетической моделью астроглиоза мозжечка оказывает выраженное влияние на трёхкомпонентный синапс в виде восстановления морфологии клеток Пуркинье и глии Бергмана. Уменьшение эксайтотоксичности в синапсах клеток Пуркинье во время применения мемантина происходит из-за восстановления экспрессии транспортёра возбуждающих аминокислот EAAT1 в глии Бергмана;

- выявлен побочный эффект мемантина в виде появления тревожности при хроническом потреблении животными с оптогенетической моделью астроглиоза мозжечка.

Результаты исследования расширяют представления о роли мутантного атаксина 1 в возникновении патологических процессов, приводящих к неврологической симптоматике при полиглутаминовых спиноцереbellярных атаксий.

С практической точки зрения, полученные данные могут быть использованы при разработке новых подходов к лечению полиглутаминовых спиноцереbellярных атаксий. Теоретические положения исследования могут

быть использованы в научных исследованиях, в процессе обучения студентов медицинских и фармацевтических вузов.

### **Оценка объема, структуры и содержания работы**

*Диссертация традиционно изложена* на 345 страницах машинописного текста, иллюстрирована 115 рисунками и 19 таблицами. Работа состоит из введения, 4 глав (обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение результатов), заключения, выводов, списка литературы. Список литературы включает 527 источников, в том числе 15 отечественных и 512 зарубежных.

*Обзор литературы* изложен на 65 страницах диссертации и представлен основными сведениями о патогенезе СЦА1, о функциях атаксина 1 в норме и его роли в патогенезе СЦА1. Часть главы посвящена описанию глии Бергмана, роли астроцитов в трёхкомпонентном синапсе, их влиянии на синаптическую передачу в норме и при нейродегенерации. Глава проиллюстрирована таблицами и рисунками. Данные обзора представлены в логической цепочке, позволяющей сделать наиболее полное заключение о состоянии проблемы в науке по выбранному направлению, что демонстрирует эрудицию автора в изучаемой проблеме.

*Материалы и методы исследования.* Описание методов очень подробное, особенно в части генетических и электрофизиологических методов исследования. Сведения о статистике представлены в специальном разделе, в котором уточняются особенности применения различных статистических подходов в каждом конкретном случае.

*Результаты и их обсуждение.* Автором очень детально и логически представлены результаты исследования в экспериментальной Главе 3, которые имеют четкую структуру: небольшое введение в качестве задачи, которую автор решает в последующих исследованиях. Жаль, что автор в конце каждой подглавки не дает краткое заключение по полученным результатам, а лишь представляет фактические результаты. Кроме того, в некоторых случаях названия рисунков представлены до самих рисунков (стр. 104, 203, 208).

При использовании векторных моделей с отсроченной экспрессией мутантного белка после формирования мозжечка диссертантом четко доказано, что выраженный мозжечковый неврологический дефицит может быть и при нормальной морфологии КП. У данных животных центральным звеном являлось нарушение синтеза mGluR и нарушение связанной с ним синаптической пластичности, такой как SSE и LTD.

В модели неселективного повреждения ГБ посредством хронической оптогенетической активации глии наблюдали нарушение захвата глутамата из-за потери EAAT1, что приводило к эксайтотоксичности и дегенерации КП, а также нарушению краткосрочной и долгосрочной синаптической пластичности.

Таким образом, в экспериментах с моделированием СЦА1 диссертант дополнил патогенетические звенья СЦА1 и определили важные молекулы-мишени для проведения патогенетической терапии данного состояния «перегрузка» убиквитин-протеасомной системы, недоразвитие и инволюция КП, уменьшение экспрессии mGluR1 на КП и нарушение функции CB1 рецепторов на пресинапсе (ПВ).

В связи с чем диссертантом были применены следующие экспериментальные терапевтические подходы - доставка рекомбинантных генов, введение стволовых клеток и фармакотерапия.

Было показано, что генетические конструкции, кодирующие белок mGluR1 для компенсации нарушенного его синтеза у СЦА1 модельных мышей в КП компенсировали mGluR опосредованную синаптическую пластичность (SSE и LTD), но влияли на морфологию КП в виде резкого уменьшения их ёмкости, координации движений, что было обусловлено зависимостью транскрипция генов от фактора транскрипции ROR $\alpha$ .

Чтобы убрать накопившиеся агрегаты полиглутаминового белка использовали AVV для доставки экзогенного белка CRAG, который способствует более активному вовлечению белков в путь деградации с помощью УПС. Внутривенное введение вектора позволяет доставить трансген в IX и X дольки мозжечка и предотвращала накопление мутантных агрегатов, приводила к улучшению дендритной дифференцировки, нормализации SSE при активации mGluR1, более эффективной генерации спайков в ответ на инъецированный ток.

Инtrateкальное введение МСК в мозжечок трансгенных B05 СЦА1 мышей обеспечило максимально большой охват зон головного мозга, не повреждало его ткани, улучшало двигательные функции, морфологию КП, синаптическую пластичность, которые сохранялись до 15 недель после введения МСК.

При фармакологической терапии было показано, что активация ГАМКВ-рецепторов баклофеном вызывает усиление передачи сигналов mGluR. Одна инъекция в мозжечок баклофена вызвала длительное (до 1 недели) улучшение двигательной активности у СЦА1 модельных мышей, хотя эффекты баклофена на передачу сигналов mGluR исчезали после вымывания баклофена в течение 24 часов. При введении мемантина было показано сохранение нормальной морфологии ГБ, а также КП, уменьшение эксайтотоксичности на оптогенетической и специфической моделях астроглиоза. Однако выявлено побочное действие мемантина в виде усиления тревожности при длительном потреблении мемантина у мышей дикого типа.

На основании данных, полученных в рамках диссертационного исследования, была сформулирована концепция о том, что при СЦА1 изменение mGluR сигнализации в КП обуславливает нарушение кратковременной и долговременной синаптической пластичности, стимулирует эксайтотоксичность, которая тесно связана с функцией ГБ. Использование вирусных векторов в качестве терапии не дало однозначного положительного решения, так как сами по себе вектора оказывают лёгкое негативное влияние на морфологию дендритов КП, а экзогенная экспрессия mGluR с помощью векторов оказала резкое негативное влияние на поведение животных и морфологию КП. Однако элиминация агрегатов мутантных белков с помощью аденовирусной экспрессии CRAG значительно улучшала атаксический фенотип и может рассматриваться как потенциальная терапия полиглутаминовых СЦА. Второй терапевтический подход – введение МСК также показал хорошие результаты в виде улучшения координации движений и восстановления функции и морфологии КП. Применение известных фармпрепаратов - агониста ГАМКв рецепторов и

антагониста NMDA рецепторов может быть рассмотрено в качестве симптоматической терапии СЦА1.

В целом в описании результатов прослеживается четкая логика изложения. Отмечается лишь небрежность в написании текста, что проявлялось в большом количестве опечаток и ошибок, использовании необычных терминов, например «раздражение» рецепторов NMDA.

Автор, обсуждая результаты в Главе 4, предложил дополненную схему патогенеза СЦА1. Центральными звеньями в данном процессе выступали нарушение mGluR1 сигнализации и развитие эксайтотоксичности. Диссертантом были обсуждены полученные данные с использованием достаточного количества цитируемой литературы, что позволило ему выдвинуть ряд предположений и выводов, логически вытекающих из собственных данных и данных литературы.

*Заключение.* В конце диссертационной работы автор делает короткое заключение, позволяющее сжато представить обсужденные результаты.

*Выводы.* По результатам диссертационной работы автором было сделано 7 выводов. В целом выводы соответствуют поставленным 7 задачам. Относительно 7-го вывода – последнее предложение в выводе «Побочными эффектами, в виде появления тревожности при хроническом потреблении мемантина, можно пренебречь, в силу выраженного его положительного влияния на структуры коры мозжечка в модели оптогенетической нейродегенерации» не является полностью обоснованным, это лишь предположение диссертанта, поэтому не стоило его выделять как вывод.

По тексту диссертации и изложения материала имеется ряд замечаний, которые изложены в отзыве по мере их встречаемости, однако замечания не имеют критического значения при оценке значимости достигнутых результатов в диссертационной работе.

### **Вопросы:**

1. Вами выявлен общий молекулярный механизм нарушения морфологии клеток Пуркинье при полиглутаминовых спиноцеребеллярных атаках в виде уменьшения экспрессии транскрипционного фактора RoR $\alpha$ . Как Вы считаете, может ли быть нарушен у пациентов и циркадный ритм, и есть ли наблюдения в клинике?

2. Вы показали, что сами по себе вектора оказывают небольшое негативное влияние на морфологию дендритов клеток Пуркинье, каков предполагаемый механизм негативного действия и есть ли различие в механизме негативного действия AAV, AVV и LVV векторов?

3. В автореферате на странице 41 написано, что «мы вводили данное средство (баклофен) per os, что очень удобно, если лечение будет применяться у больных полиглутаминовыми СЦА». Тогда как в диссертации описаны моторные функции животных при введении баклофена в мозжечок и только одно предложение есть на странице 244 о том, что «однократное пероральное введение баклофена уменьшает атаксические проявления у СЦА1 мышей в течение 7 дней». Поясните, пожалуйста, как реально вводился препарат при изучении двигательных нарушений?

### **Заключение:**

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 законченной научно-квалификационной работой, в которой на основании проведенных автором исследований разработаны новые теоретические положения, совокупность которых можно квалифицировать как значимое научное достижение.

По актуальности, достоверности результатов, опубликованных в рецензируемых международных журналах, степени обоснованности научных положений и выводов диссертационная работа соответствует требованиям «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а ее автор Шуваев Антон Николаевич достоин присуждения ученой степени доктора медицинских наук по специальностям 3.3.3 – патологическая физиология и 1.5.22 – клеточная биология.

19 февраля 2024

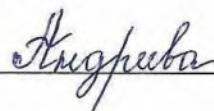
Доктор биологических наук, профессор,  
заведующий кафедрой нормальной физиологии  
им. Н.Ю. Беленкова федерального государственного  
бюджетного образовательного учреждения  
высшего образования «Приволжский  
исследовательский медицинский университет»  
Министерства здравоохранения  
Российской Федерации



Мухина И.В.

603005, г. Нижний Новгород,  
пл. Минина и Пожарского, 10/1.  
Тел. 8(904)797 55 50  
e-mail [muhina\\_i@pimunn.net](mailto:muhina_i@pimunn.net)  
Сайт организации: <http://pimunn.ru/>

Подпись Мухиной И.В. заверяю  
Ученый секретарь федерального государственного  
бюджетного образовательного учреждения  
высшего образования «Приволжский  
исследовательский медицинский университет»  
Министерства здравоохранения  
Российской Федерации, д.б.н.



Андреева Н.Н.