

УТВЕРЖДАЮ
Директор Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
Института химической биологии
и фундаментальной медицины
Сибирского отделения Российской академии наук
Академик, д.х.н., проф. Власов Валентин Викторович
«20» декабря 2015 г.



ОТЗЫВ

Ведущей организации

Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук о научно-практической значимости диссертационной работы Некрасова Евгения Дмитриевича «Моделирование болезни Гентингтона с помощью индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика.

Актуальность исследования

Диссертационное исследование Некрасова Евгения Дмитриевича посвящено разработке модели и изучению болезни Гентингтона – наследственного нейродегенеративного заболевания при котором происходит прогрессирующая гибель нейронов стриатума. При этом наиболее подвержены гибели срединные шипиковые нейроны стриатума. Известно, что это заболевание связано с ростом количества тринуклеотидных повторов в гене *HTT*, увеличение количества повторов более 36 приводит к неотвратимому развитию заболевания. В случае, когда количество повторов составляет 60 и более наблюдается наиболее тяжелая, ювенильная форма заболевания. На исследовании именно этой формы заболевания в основном и сконцентрировано внимание исследователей болезни Гентингтона, в то время как нейродегенеративные изменения, вызываемые наличием меньшего количества повторов в гене *HTT*, могут отличаться как набору

внутриклеточных событий, так и в плане выбора терапевтических препаратов и их дозировки.

Очевидно, что создание клеточных моделей болезни Гентингтона не может быть ориентировано на получение клеток от пациентов, поэтому авторами проекта было предложено использовать для моделирования этого заболевания технологию получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) с последующей дифференцировкой этих клеток в клетки требуемого типа. Представленная работа направлена на получение и детальную характеристику требуемых клеток, причем от пациентов с небольшим количеством повторов, что позволяет смоделировать заболевание в более легкой форме, исследовать клеточную физиологию и эффективность лекарственных средств более адекватно, чем на модели ювенильной формы. Учитывая достаточно высокую частоту встречаемости этой болезни, актуальность исследования не вызывает сомнений.

Научная новизна работы и практическая ценность результатов

В представленной работе впервые были использованы в качестве модельного объекта нейроны с характеристиками срединных шипиковых нейронов стриатума, дифференцированные из человеческих ИПСК с небольшим количеством CAG-повторов в гене *HTT*. Впервые было показано, что нейроны, полученные из ИПСК с мутацией в гене *HTT*, демонстрируют повышенную частоту инвагинаций клеточного ядра. Продемонстрировано, что метод морфометрии клеточных ядер может быть использован для количественной оценки фенотипического проявления болезни Гентингтона. Впервые на нейронах человека с мутацией в гене *HTT* показан повышенный депо-управляемый внутриклеточный транспорт кальция. Впервые показано, что соединение EVP4593 нормализует транспорт кальция и содержание лизосом в нейронах человека с мутацией в гене *HTT* и может ингибировать апоптоз нейронов, индуцированный ингибиторами функционирования протеасом. Результаты представленного исследования расширяют понимание молекулярных механизмов болезни Гентингтона, демонстрируют возможности использования ингибиторов кальциевых каналов для терапии болезни Гентингтона. Разработанная технология получения дифференцированных нейронов полосатого тела может быть полезна для поиска новых лекарств от болезни Гентингтона.

Структура диссертационной работы

Диссертационная работа Некрасова Е.Д. написана традиционно и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и обсуждения, заключения, а также выводов, списка цитируемой литературы. Работа изложена на 93 страницах машинописного текста, включает 23 рисунка и 4 таблицы. Список цитируемых литературных источников включает 182 наименования.

Характеристика диссертации

Во **Введении** обоснована актуальность темы диссертации, ее практическая значимость и новизна, сформулированы цель и задачи исследования, приведены положения, выносимые на защиту.

Глава 1 «Обзор литературы» состоит из десяти основных частей. Приведены данные о репрограммировании ядра соматической клетки, в частности о генетическом репрограммировании соматических клеток до плюрипотентного состояния. Рассказано о возможностях дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток в нейроны и использовании генетического репрограммирования для изучения и лечения нейродегенеративных заболеваний, приведены результаты исследований по моделированию шизофрении, бокового амиотрофического склероза, а также болезней Альцгеймера, Паркинсона, Гентингтона с использованием ИПСК человека. Обсуждены перспективы моделирования болезни Гентингтона с помощью ИПСК. Обзор литературы диссертационного исследования изложен последовательно, затронутые вопросы имеют непосредственное отношение к теме диссертационной работы и достаточно полно описывают состояние дел в данной области. Обзор литературы демонстрирует, что выбранная автором область исследования развивается быстрыми темпами, и исследования, которым посвящена диссертационная работа, могут дополнить и расширить существующее понимание проблемы.

Глава 2 «Материалы и методы» содержит описание методов, использованных в исследовании. В диссертационном исследовании были использованы разнообразные методы клеточной и молекулярной биологии, электрофизиологические методы. Описаны статистические методы обработки результатов, а также биоинформатические подходы к исследованию дифференциально экспрессированных генов. Материал изложен достаточно четко и дает представление об использованных подходах. Использованные автором методы современны, адекватны

поставленным задачам и демонстрируют высокий методический уровень автора.

Глава 3 «Результаты и обсуждение» содержит шестнадцать разделов и описывает результаты проведенного диссертантом исследования. Получение ИПСК от пациентов с болезнью Гентингтона и их характеристика описаны ясно и детально. Описан способ дифференцировки ИПСК человека в срединные шипиковые нейроны стриатума. Подробно описано сравнение срединных шипиковых нейронов стриатума полученных из мутантных и нормальных ИПСК, результаты сопровождаются качественными иллюстрациями. Выполнено количественное сравнительное исследование нормальных и мутантных нейронов. В рамках этого исследования оценено содержание лизосом, кривизна оболочки клеточного ядра, депо-управляемые кальциевые токи. Найдены количественные отличия между мутантными и нормальными нейронами. Изучено действие потенциального лекарства от болезни Гентингтона – ингибитора кальциевых каналов EVP4593 на фенотипические проявления болезни в нейронах, дифференцированных из ИПСК. К достоинствам работы следует отнести разнообразие методических подходов, реализованных в том числе и в сотрудничестве с другими лабораториями (ИНЦ РАН, ИЦиГ СО РАН). Такое сотрудничество лабораторий разного профиля позволило получить новые данные, углубляющие представления о клеточной патофизиологии болезни Гентингтона.

В **Заключении** изложены полученные автором результаты и подчеркнута их значимость в контексте современного состояния проблемы.

Выводы, сделанные автором, хорошо аргументированы и соответствуют поставленным задачам.

Однако к диссертационной работе имеются следующие **замечания**:

В главе литературный обзор авторам можно было бы порекомендовать более развернуто описать варианты используемой терапии болезни Гентингтона, лекарственных препаратов и механизмов их действия. В том числе имело бы смысл описать механизмы действия используемых в работе химических соединений (MG132, EVP4593). В описании результатов автор приводит некоторые данные, но расширение этой главы, несомненно, помогло бы в понимании работы и было бы логичным.

В главе материалы и методы имело бы смысл более детально описать некоторые разделы, например, инфицирование клеток вирусами, бионформационный анализ.

В главе результаты и обсуждение автор мог бы более детально проанализировать полногеномные данные, что, возможно, позволило бы найти дополнительные маркеры и «переключатели» вовлеченные в развитие исследуемой патологии.

В целом диссертационная работа Некрасова Е.Д. выполнена на высоком научном и методическом уровне, и предъявленные замечания никак не умаляют научной значимости проделанной работы.

Заключение

Содержание работы полностью отражено в 6 статьях, которые опубликованы в журналах, соответствующих Перечню ВАК России для опубликования основных научных результатов диссертации. Полученные автором данные были представлены в виде докладов на 7 международных конференциях. Автор принимал участие в написании главы одной научной монографии.

Достоверность полученных автором результатов и сделанных на их основе выводов не оставляет сомнений. Положение автора в составе авторского коллектива в опубликованных работах свидетельствует о личном вкладе диссертанта в выполненное исследование. Полученные результаты могут быть использованы исследовательскими научными, а также медицинскими клиническими учреждениями.

Автореферат диссертации полностью отражает основное содержание текста диссертации. Таким образом, диссертация Некрасова Евгения Дмитриевича «Моделирование болезни Гентингтона с помощью индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека» является законченной оригинальной работой, научное и практическое значение которой в области генетики и медицины не вызывает сомнений. По своему содержанию, уровню выполнения научных исследований, научной новизне и практической значимости полученных результатов диссертация соответствует заявленной специальности и полностью отвечает требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября

2013 г., предъявляемым к кандидатским диссертациям; а ее автор, Некрасов Евгений Дмитриевич, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 - генетика (биологические науки).

Отзыв на диссертационную работу Некрасова Е.Д. «Моделирование болезни Гентингтона с помощью индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека» рассмотрен, обсужден и одобрен на ученом совете ИХБФМ СО РАН 30 ноября 2015 года, протокол № 12. Результаты голосования: за – 15 голосов, против – 0 голосов, воздержавшихся – 0 голосов.

Отзыв составлен 30 ноября 2015 года Зав. Лабораторией молекулярной медицины ИХБФМ СО РАН, к.б.н. (специальность 03.00.04 – биохимия) Лактионовым Павлом Петровичем.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (ИХБФМ СО РАН), 630090, г. Новосибирск, пр. Ак. Лаврентьева, 8, Телефон: (383) 363-51-50, E-mail: kms@niboch.nsc.ru, lakt@list.ru (Лактионов П.П.). www.niboch.nsc.ru

Зав. Лаб. молекулярной медицины

ИХБФМ СО РАН, к.б.н.

(специальность 03.00.04 – биохимия)

Лактионов Павел Петрович

с.н.с. ИХБФМ СО РАН, д.б.н.

(специальность 03.00.04 – биохимия)

Рыкова Елена Юрьевна

Подписи заверяю:

ученый секретарь ИХБФМ СО РАН

к.х.н.



Пестряков Павел Ефимович