

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу Некрасова Евгения Дмитриевича «Моделирование болезни Гентингтона с помощью индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – Генетика.

Диссертационная работа Е.Д. Некрасова посвящена исследованию болезни Гентингтона с использованием модельной системы на основе репрограммированных клеток человека. Болезнь Гентингтона – нейродегенеративное заболевание, оно наследуется по аутосомно-доминантному типу и характеризуется прогрессирующей гибелью нейронов полосатого тела головного мозга (стриатума). Распространенность болезни Гентингтона составляет 3-7 случаев на 100000 человек населения в странах западной и восточной Европы. Клинические проявления заболевания обычно развиваются в 35-44 года и неизбежно приводят к смерти, болезнь не излечима. В 1993 году был идентифицирован ген хантингтин, аномальная экспансия тринуклеотидных CAG-повторов в котором является причиной болезни Гентингтона. Болезнь развивается, когда число повторов превосходит 36. С ростом количества CAG-повторов проявления болезни становятся более яркими, а возраст дебюта заболевания значительно снижается, вплоть до детского возраста. Возможности использования нейронов пациентов в качестве *in vitro* модельной системы были сильно ограничены, поэтому основные результаты были получены на других организмах. Исследования болезни Гентингтона с использованием трансгенных моделей на животных выявили целый спектр нарушений, вызываемых мутантным хантингтином: формирование агрегатов мутантного хантингтина, повышенное содержание аутофагосом и активных форм кислорода в клетках, изменения экспрессии генов и другие, но эти нарушения в модельных организмах детектировались только при большом избыточном количестве 60 и более CAG-повторов и лишь частично воспроизводили заболевание. До сих пор остается неясным, каким образом мутация в гене хантингтине приводит к гибели нейронов, методов лечения болезни Гентингтона еще не найдено. Изобретенная в 2006 году технология генетического репрограммирования соматических клеток открыла возможность получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека, которые по своим свойствам аналогичны эмбриональным стволовым клеткам: их можно неограниченно наращивать в культуре и дифференцировать в любые типы клеток. Так появилась возможность искусственно получать пациент-специфичные нейроны человека в любых требуемых количествах. Хотя нейроны, дифференцированные из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека, были использованы для моделирования болезни Гентингтона, эти исследования имели ряд недостатков. В подавляющем большинстве работ были использованы клетки с большим количеством CAG-повторов (60 и более) в гене хантингтине, что соответствует ювенильной форме хорей Гентингтона, которая может принципиально отличаться от классической формы болезни Гентингтона по молекулярным механизмам. Более того, культуры нейронов, дифференцированные из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека, содержали малый процент срединных шипиковых нейронов стриатума – типа клеток, наиболее подверженного дегенерации. По этим причинам разработка и исследование новых,

более совершенных модельных систем на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека является актуальной задачей.

В представленной работе Е.Д. Некрасова описана единственная в Российской Федерации коллекция гетерозиготных линий индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека с избыточным количеством CAG-повторов в гене хантингтине, разработан оригинальный протокол, который позволяет воспроизводимо и эффективно получать срединные шипиковые нейроны стриатума из плюрипотентных стволовых клеток человека. Впервые показано, что пациент-специфичные нейроны с мутацией в гене хантингтине демонстрируют повышенную частоту ядерных инвагинаций и повышенное содержание аутофагосом. Впервые на нейронах, полученных методом генетического репрограммирования и дифференцировки фибробластов кожи от пациентов – носителей мутантного аллеля в гене хантингтине продемонстрирован повышенный депо-управляемый вход кальция. Впервые продемонстрирована нейродегенерация патологических пациент-специфичных нейронов в модели старения, вызванного снижением активности протеасомного аппарата деградации белков. Впервые продемонстрирована способность соединения EVP4593 предотвращать гибель нейронов в разработанной модели старения, а также нормализовать депо управляемый вход кальция и содержание лизосом.

Диссертационная работа Е.Д. Некрасова изложена на 93 страницах машинописного текста, включает 23 рисунка и 4 таблицы. Список цитируемой литературы включает 182 наименования. Диссертация построена по традиционному плану и содержит: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, выводы, список сокращений, список литературы.

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

«Обзор литературы» состоит из 10 разделов и посвящён технологиям репрограммирования клеток, в частности генетическому репрограммированию соматических клеток до плюрипотентного состояния, подходам к моделированию нейродегенеративных заболеваний с использованием индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека, полученных методом генетического репрограммирования. Темы, затронутые в обзоре, непосредственно связаны с задачами диссертационной работы.

В главе «Материалы и методы» изложен широкий спектр методов из 39 наименований, куда входят молекулярно-генетические, культуральные, биоинформатические и статистические методы, использованные автором для решения поставленных задач. Для решения поставленных задач автор применяет самые современные методы исследования.

Полученный Е.Д. Некрасовым в процессе решения поставленных задач экспериментальный материал представлен в 16 разделах главы «Результаты и обсуждение». Эти результаты подробно изложены, хорошо документированы и иллюстрированы. На первом этапе работы был разработан протокол получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека, получены и охарактеризованы линии индуцированных плюрипотентных стволовых клеток от трех пациентов с болезнью Гентингтона, наблюдавшихся ФБГУ «Научный центр

неврологии». На втором этапе работы был разработан эффективный протокол дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток человека в срединные шипиковые нейроны стриатума. На следующем этапе был проведен сравнительный анализ патологических и нормальных нейронов, дифференцированных по разработанному протоколу из плюрипотентных стволовых клеток, был выявлен целый ряд нарушений в патологических нейронах, связанных с нарушением процессов аутофагии и депо-управляемого входа кальция в клетку, а также нарушением структуры ядра и повышенной смертностью патологических нейронов. Были продемонстрированы способы количественной оценки этих нарушений. На последнем этапе было изучено действие идентифицированного ранее соединения EVR4593 на выявленные нарушения.

В «Заключении» изложены полученные автором результаты и подчеркнута их значимость, описаны перспективы дальнейшей разработки темы.

По прочтении диссертационной работы возникли следующие вопросы и замечания:

- 1) На рисунке 8 приведена электрофореграмма продуктов ПЦР-амплификации участка гена НТТ, содержащего СAG-повтор с геномной ДНК использованных в работе патологических (iPSHD11, iPSHD22, iPSHD34) и нормальных (iPSRG2L, endo-iPS 12, hESM01) линий ПСК. Отмечается, что более высокие полосы соответствуют большей экспансии СAG-повтора. В дорожках геля, соответствующих образцам нормальных клеточных линий, наблюдаются продукты ПЦР в области нормальных длин СAG-повтора хантингина. В то же время в дорожках, соответствующих образцам патологических клеточных линий, наряду с ожидаемыми продуктами ПЦР в области незначительной экспансии повтора, наблюдаются также четкие сигналы в областях длин значительной экспансии. В нормальных образцах этого явления не наблюдается. Не свидетельствует ли возникновение ПЦР-продуктов в областях длин значительной экспансии о нестабильности тринуклеотидного повтора в клеточных линиях, полученных от больных, и можно ли однозначно утверждать, что полученные клеточные линии представляют собой адекватную модель для изучения умеренной экспансии тринуклеотидного повтора в гене хантингина?
- 2) Выводы сформулированы очень скромно и сухо, что, на мой взгляд, снижает их информативность. Особенно обращают на себя внимание выводы 1 и 2, в которых просто констатируется что разработан протокол и с его помощью создана коллекция клеток, а также проведена характеристика этих клеток. Эти выводы выглядели бы содержательнее, если бы в них содержалась сжатая характеристика как особенностей протокола (отличий от аналогов), так и свойств созданных клеточных моделей.

Представленные замечания ни в коей мере не снижают научной и практической ценности проведенного исследования, и могут рассматриваться автором как рекомендации, относящиеся к будущим работам.

Содержание работы отражено в 14 печатных работах, 6 из которых статьи в журналах, соответствующих Перечню ВАК России для опубликования основных научных результатов диссертации, 7 тезисов научных докладов на международных

конференциях и одна глава монографии. Автореферат в полной мере отражает содержание диссертации.

Таким образом, представленная диссертационная работа Е.Д. Некрасова «Моделирование болезни Гентингтона с помощью индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека» по своей структуре и содержанию в полной мере отвечает требованиям пункта 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» №842, утверждённого Правительством Российской Федерации от 24 сентября 2013 г., а ее автор Некрасов Евгений Дмитриевич заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика.

Руководитель лаборатории
эпигенетики
ФГБНУ «МГНЦ»
д.б.н., доцент по специальности
03.02.07 – генетика

Стрельников Владимир Викторович
01 декабря 2015 г.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр» Россия, 115478, г. Москва, ул. Москворечье, д. 1,
Телефон: +7 (499)612-86-07, E-mail: mgnc@med-gen.ru

Подпись Стрельникова В.В. заверяю:
Ученый секретарь
ФГБНУ «МГНЦ»
к.м.н.



Смирнихина Светлана Анатольевна