



УТВЕРЖДАЮ:
Директор Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
Института общей генетики им. Н.И. Вавилова
Российской академии наук
член-корр. РАН Н.К. Янковский

23 сентября 2015 г.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук

Диссертация "Моделирование болезни Гентингтона с помощью индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека" выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук.

В период подготовки диссертации с 2011 по 2014 гг. Некрасов Евгений Дмитриевич обучался в очной аспирантуре Московского физико-технического института (государственного университета).

С 2009 г. по настоящее время работает в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук.

В 2011 г. окончил факультет молекулярной и биологической физики Московского физико-технического института (государственного университета) по специальности прикладные математика и физика.

Удостоверение о сдаче кандидатских экзаменов выдано в 2015 г. Федеральным государственным бюджетным учреждением науки Институте общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук.

Научный руководитель – д.б.н., проф. Киселев Сергей Львович, заведующий лабораторией эпигенетики в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук.

По итогам рассмотрения диссертации "Моделирование болезни Гентингтона с помощью индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека" принято следующее **заключение:**

Актуальность исследования

Болезнь Гентингтона – это неизлечимое наследственное нейродегенеративное заболевание, характеризующееся прогрессирующей гибелью нейронов стриатума. Распространенность болезни Гентингтона в странах Западной и Восточной Европы составляет 3-7 случаев на 100000 человек населения. В 1993 году был идентифицирован ген *HTT*, аномальная экспансия тринуклеотидных CAG-повторов в котором является причиной болезни Гентингтона, болезнь развивается когда число повторов превосходит 36. Однако до сих пор не известно каким образом мутация в гене *HTT* приводит к гибели нейронов. Модели болезни Гентингтона на животных лишь частично воспроизводят заболевание, а возможности использования в качестве модельной системы нейронов от пациентов сильно ограничены. Разработанная в 2006 году технология получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток открыла новое направление в моделировании заболеваний человека ввиду уникальных свойств ИПСК: их можно получить от любого пациента, неограниченно растить в культуре и дифференцировать в любые типы клеток. Таким образом, появилась возможность искусственно получать пациент-специфичные нейроны человека в любых требуемых количествах. Хотя уже были предприняты попытки в моделировании болезни Гентингтона с использованием ИПСК, до сих пор никто не исследовал дифференцированные из ИПСК срединные шипиковые нейроны стриатума – наиболее подверженный нейродегенерации тип клеток, а большинство различий между нормальными и патологическими нейронами из ИПСК получены на

линиях ИПСК с большим количеством CAG повторов (60 и более), что соответствует ювенильной форме хорей Гентингтона, которая может принципиально отличаться от классической формы болезни Гентингтона по молекулярным механизмам. Разработка и исследование новых более совершенных модельных систем на основе ИПСК человека является актуальной задачей.

Научная новизна и практическая значимость исследования

В представленной работе впервые были использованы в качестве модельного объекта нейроны с характеристиками срединных шипиковых нейронов стриатума, дифференцированные из человеческих ИПСК с небольшой экспансией CAG-повторов в гене *HTT*. Впервые показано, что дифференцированные из ИПСК нейроны с мутацией в гене *HTT* демонстрируют повышенную частоту ядерных инвагинаций, также показана возможность количественной оценки этого проявления болезни Гентингтона методом морфометрии клеточных ядер. Впервые на нейронах человека с мутацией в гене *HTT* продемонстрирован повышенный депо-управляемый вход кальция. Впервые продемонстрирована способность соединения EVP4593 нормализовать депо-управляемый вход кальция и содержание лизосом в нейронах человека с мутацией в гене *HTT*, а также способность EVP4593 спасти от гибели нейроны человека в модели старения. Результаты данного исследования вносят вклад в общее понимание молекулярных механизмов болезни Гентингтона и открывают перспективу создания нового лекарственного средства. Разработанная в данном исследовании модельная система может быть полезна для поиска новых лекарств от болезни Гентингтона.

Степень достоверности результатов проведенных исследований

Работа выполнена на высоком методическом уровне с применением самых современных методов молекулярной генетики и клеточной биологии. Результаты, полученные Некрасовым Е.Д., достоверны и воспроизводимы.

Соответствие диссертационной работы избранной специальности

Диссертационная работа соискателя Некрасова Е.Д. соответствует избранной специальности 03.02.07 – генетика (согласно п.п. 8, 10, 17 Паспорта номенклатуры специальностей научных работников по данной специальности).

Личный вклад автора в исследование

Автор принимал личное участие на всех этапах выполнения работы, а именно: в оптимизации протокола получения ИПСК, получении и характеристике ИПСК от пациентов с болезнью Гентингтона (совместно с Лагарьковой М.А., Богомазовой А.Н., Лебедевой О.С.), разработке эффективного протокола дифференцировки ИПСК в срединные шипиковые нейроны стриатума, изучении нейронов методами иммуоцитохимии и ПЦР, исследовании нейронов методом электронной микроскопии (совместно с Сульдиной Л.А. и Киселевой Е.В.), исследовании нейронов методом морфометрии клеточных ядер, исследовании нейронов методом проточной цитометрии (совместно с Васиной Е.М.), изучении электрофизиологических свойств нейронов (совместно с Вигонтом В.А. и Казначеевой Е.В.), исследовании гибели нейронов в модели старения. Автор лично проводил обработку полученных результатов и оформлял результаты для представления в виде тезисов и докладов на научных конференциях, а также принимал участие в написании и опубликовании статей по результатам работы.

Полнота изложения материалов диссертации в печатных работах

Основные положения и результаты диссертационного исследования изложены автором в 14 печатных работах, в том числе в 6 статьях по теме диссертационной работы в журналах, входящих в перечень рецензируемых научных журналов и изданий, рекомендованных ВАК Минобрнауки для опубликования основных научных результатов диссертации, в 7 тезисах, представленных на российских международных конференциях и 1 главе монографии. В опубликованных работах полностью изложен материал диссертации.

Диссертация Некрасова Евгения Дмитриевича на тему "Моделирование болезни Гентингтона с помощью индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека" является научно-квалификационной работой, в которой описана новая модельная система для поиска лекарств от болезни Гентингтона на основе дифференцированных из ИПСК человека срединных шипиковых нейронов стриатума, также продемонстрировано применение этой модельной системы для изучения терапевтического потенциала соединения EVP4593. Работа Некрасова Е.Д. соответствует критериям, которым должна отвечать диссертация, представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 «Генетика».

Диссертация "Моделирование болезни Гентингтона с помощью индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека" Некрасова Евгения Дмитриевича рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика.

Заключение принято на межлабораторном семинаре отдела эпигенетики. Присутствовало на заседании 12 чел. Результаты голосования: «за» - 12 чел., «против» - 0 чел., «воздержалось» - 0 чел., протокол от 8 сентября 2015 г.

Руководитель семинара,
зав. лаб. ИОГен РАН, д.б.н., проф.



Муха Д.В.