

О Т З Ы В

на автореферат диссертации Ольги Сергеевны Лебедевой
"Создание модельной системы для изучения функции
генов, ассоциированных с болезнью Паркинсона, с использованием
технологии генетического репрограммирования",
представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 03.02.07 – генетика

Диссертационная работа О.С. Лебедевой посвящена разработке модельной системы для изучения болезни Паркинсона, механизмов ее развития и скрининга потенциальных лекарственных препаратов, с помощью технологии генетического репрограммирования. Эта работа имеет особый смысл, если учесть, что используемые на данный момент модельные системы имеют целый ряд существенных ограничений. Это связано и с отличным от человека путем метаболизма лекарственных средств у экспериментальных животных, и с не всегда адекватным воспроизведением симптомов заболевания при индукции болезни Паркинсона путем введения химических веществ или сверхэкспрессией мутантных генов. Перспективной модельной системой в этой ситуации оказываются культуры терминально дифференцированных дофаминергических нейронов. В своей работе О.С. Лебедева представляет высокоэффективную, относительно простую и малозатратную методику получения таких культур нейронов из фибробластов кожи взрослых людей через стадию индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК).

ИПСК в представленной работе были получены с помощью четырех транскрипционных факторов (*Oct4*, *Sox2*, *Klf4*, *c-Myc*), вводимых с помощью интеграционного (лентивирус) и неинтеграционного (вирус Сендай) методов. Оказалось, что при использовании этих двух подходов ИПСК не различаются ни по экспрессии факторов поддержания плюрипотентного состояния, ни в функциональных тестах, ни по паттерну полногеномного метилирования. Необходимо отметить, что последний анализ в работе О.С. Лебедевой был проведен впервые в мире. Однако опасность использования лентивирусной доставки генов заключается в вероятности, хотя и невысокой, нарушения функциональных областей генома при интеграции ретровируса. Поэтому возникает вопрос – для чего вообще использовать лентивирусную трансдукцию для получения ИПСК и нельзя ли полностью отказаться от неё в пользу такого мощного и безопасного инструмента, как вирус Сендай?

На следующем этапе работы был разработан уникальный подход к дифференцировке ИПСК в дофаминергические нейроны. Было убедительно показано, что клетки от пациентов с мутациями в генах, ассоциированных с наследственными формами болезни Паркинсона, морфологически и иммуноцитохимически не отличаются от клеток здоровых доноров на всех этапах дифференцировки. Подробным образом были охарактеризованы популяции терминальных тирозингидроксилаза-положительных нейронов.

Было доказано, что они экспрессируют маркеры зрелых нейронов, не пролиферируют и способны к выбросу дофамина. Чистота получаемой популяции терминально дифференцированных нейронов по предложенной в работе О.С. Лебедевой методике достигает потрясающих 70-90%, а это притом, что на всех этапах дифференцировки нет ни одного механического отбора нейрональных предшественников.

Все манипуляции проводились параллельно для фибробластов кожи здоровых доноров и больных с болезнью Паркинсона. Оказалось, что мутации, ассоциированные с развитием наследственных форм болезни Паркинсона, не влияют ни на эффективность генетического репрограммирования, ни на эффективность последующей дифференцировки ИПСК в дофаминергические нейроны. Это значит, что полученные клетки представляют собой адекватную модель дофаминергических нейронов для последующего изучения болезни Паркинсона.

Особого внимания заслуживает предложенный в методике отбор нейрональных предшественников на разных стадиях дифференцировки с целью биобанкирования. Создание подобной коллекции – это возможность сохранять большое количество предшественников на разных этапах дифференцировки не только с целью экономии времени и реактивов для ускорения последующей дифференцировки в терминальные функционирующие нейроны, но и с целью дальнейших фундаментальных научных исследований другими методами. Плюсом также является стандартизация экспериментов.

Помимо описания и всесторонней характеристики разработанной модели получения дофаминергических нейронов из ИПСК в работе О.С. Лебедевой приведен первый эксперимент с применением этой модели, а именно полногеномный транскриптомный анализ популяций ИПСК от здоровых доноров и пациентов с болезнью Паркинсона на разных этапах нейрональной дифференцировки. Этот анализ впервые показал большие отличия в паттерне экспрессии генов метаболических путей, связанных с функционированием митохондрий, фагосом и лизосом, у пациентов с болезнью Паркинсона по сравнению со здоровыми донорами. Этот результат чрезвычайно важен, поскольку накопление нефункциональных митохондрий (и, как следствие, повышение гликолитических ферментов) с самых ранних этапов нейрональной дифференцировки происходит, по-видимому, задолго до манифестации заболевания и может служить мишенью терапевтического воздействия.

Все этапы исследования в высшей степени подробно изложены в автореферате. Следует особо отметить очень четкую организацию автореферата, включая логику, представление и обсуждение результатов экспериментов. Автореферат содержит необходимый и четко выверенный иллюстративный материал. Все это дает возможность ясного понимания довольно сложных методических подходов и делает недвусмысленной интерпретацию полученных данных.

В своей работе О.С. Лебедева использовала впечатляюще широкий спектр методик, включая самые современные полногеномные технологии анализа метилирования ДНК и экспрессии генов. Выводы работы в полной мере адекватны поставленным задачам, результаты диссертации опубликованы в российской и международной периодической печати, а также доложены на российских и международных съездах, симпозиумах и конференциях. Они полностью отражают все задачи работы и положения, выносимы на защиту. Таким образом, я считаю, что работа О.С. Лебедевой «Создание модельной системы для изучения функции генов, ассоциированных с болезнью Паркинсона, с использованием технологии генетического репрограммирования», по значимости, актуальности и новизне работа соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор заслуживает присвоения искомой степени по специальности 03.02.07 – генетика.

научный сотрудник
лаборатории цитогенетики и молекулярной генетики
к.б.н. по специальности
03.01.03 – молекулярная биология

Зеркаленкова Елена
Александровна

18 октября 2016 г.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения Российской Федерации,

Россия, 117997, Москва, ул. Саморы Машела, д. 1, ГСП-7,

тел/факс +7(495)2876570,

факс +7 (495) 664 70 90,

адрес электронной почты: info@fnkc.ru

Подпись Зеркаленковой Е.А. заверяю
Ученый секретарь ФГБУ «ФНЦД ДГОИ
им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России
Спиридонова Елена Александровна

