

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ

**ИНСТИТУТ
ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ
И ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ
МЕДИЦИНЫ**

**СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
(ИХБФМ СО РАН)**

Просп. ак. Лаврентьева, 8, г. Новосибирск, 630090

тел. (383) 363-51-50

факс (383) 363-51-53

E-mail: niboch@niboch.nsc.ru

http://www.niboch.nsc.ru

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

«10» октября 2016 г.



01 октября 2016. № 15209-13-03/594

На № _____

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 Лебедевой Ольги Сергеевны «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.

Актуальность исследования

Диссертационное исследование Лебедевой Ольги Сергеевны посвящено созданию и изучению клеточной модели болезни Паркинсона – нейродегенеративного заболевания центральной нервной системы, при котором происходит прогрессирующая гибель дофаминергических нейронов черной субстанции. Современные методы лечения позволяют замедлить развитие заболевания, однако они не приводят к купированию симптомов и выздоровлению пациентов. Несмотря на то, что этиология болезни Паркинсона изучена недостаточно, достоверно известно, что наследственные факторы играют важную роль в развитие этого заболевания. Достоверно известны некоторые мутации, приводящие к развитию этого заболевания, что позволяет, по меньшей мере, для больных с такими мутациями, создавать клеточные модели необходимые для поиска терапевтических агентов, оптимизации лекарственной терапии. Поскольку прижизненное получение требуемого клеточного материала невозможно, единственным вариантом для получения требуемых культур клеток является получение плюрипотентных стволовых клеток из клеток доноров, имеющих мутантный фенотип, с последующей

дифференцировкой этих клеток в клетки требуемого фенотипа - постмитотические дофаминергические нейроны.

Представленная работа направлена на получение и детальную характеристику культур постмитотических дофаминергических нейронов из ИПСК пациентов с наследственными формами (мутации генах *PARK2* и *PARK8*) болезни Паркинсона и пациентов не страдающих этим заболеванием. Учитывая распространенность болезни Паркинсона и востребованность разрабатываемых автором клеточных моделей, актуальность исследования не вызывает сомнений.

Научная новизна работы и практическая ценность результатов

В представленной работе впервые в России были получены линии пациент-специфичных ИПСК, несущие мутации в генах *PARK2* и *PARK8*. Выполнено исследование влияния интеграционного и неинтеграционного методов репрограммирования фибробластов человека на метилирование ДНК. При помощи Infinium 450K BeadChips показано, что способ доставки репрограммирующих факторов не влияет на метилирование ДНК ИПСК. Разработан эффективный протокол, который позволяет получать культуры клеток на 80% состоящие из дофаминергических нейронов экспрессирующих тирозингидроксилазу и секретирующих дофамин. При этом автор сумел исключить трудноконтролируемые стадии и сделать протокол максимально воспроизводимым. Кроме того, разработанный автором протокол позволяет получать и длительно хранить клетки на разных стадиях дифференцировки, что существенно упрощает и удешевляет исследования. При помощи микрочипов HT-12v4 Expression BeadChips (Illumina) выполнен сравнительный анализ транскриптомов нейронов, с мутантным фенотипом и нормальных нейронов на разных стадиях дифференцировки. Обнаружены дифференциально экспрессированные гены, которые могут участвовать в развитие болезни Паркинсона. Таким образом, впервые разработаны экспериментальные модели для изучения каскада событий, связанных с мутациями в генах *PARK2* и *PARK8* и позволяющие моделировать развитие патогенеза БП *in vitro*. Научная новизна и практическая ценность работы не вызывают сомнений.

Структура диссертационной работы

Диссертационная работа Лебедевой О.С. изложена на 158 страницах машинописного текста и включает введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, выводы, список использованных сокращений, список цитируемой литературы и приложения. Диссертация содержит 24 рисунка и 15 таблиц. Библиографический указатель содержит 218 источников.

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 двух основных частей, которые разделены на подпункты. Приведены данные о репрограммировании ядра соматической клетки, в частности о генетическом репрограммировании соматических клеток до плюрипотентного состояния. Рассмотрены интеграционные и неинтеграционные методы репрограммирования. Описано изменение состояния метилирования ДНК в процессе репрограммирования. Обсуждены возможности дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток в нейроны и использование дифференцированных производных для изучения нейродегенеративных заболеваний. Освещены современные данные о патогенезе болезни Паркинсона и изменениях, вызываемых заболеванием, на клеточном уровне. Подробно рассмотрены наследственные факторы, приводящие к развитию болезни Паркинсона. Обзор литературы диссертационной работы изложен последовательно, затронутые вопросы имеют непосредственное отношение к теме диссертационной работы и достаточно полно описывают состояние исследований в данной области. Обзор литературы демонстрирует, что выбранная автором область исследований развивается быстрыми темпами, и исследования, которым посвящена диссертационная работа, востребованы научным сообществом.

Глава 2 «Материалы и методы» содержит описание методов, использованных в исследовании. Для выполнения исследования автором были использованы методы клеточной и молекулярной биологии, химического анализа, современные методы исследования экспрессии генов и метилирования геномов. Описаны статистические методы обработки результатов, а также биоинформационные подходы к исследованию дифференциально экспрессированных генов. Материал изложен достаточно четко и дает представление об том, что автором был использован внушительный набор современных методов. Автором были использованы современные методы, которые позволяют решать поставленные в работе задачи на высоком экспериментальном уровне и демонстрируют высокую методическую подготовку автора.

Глава 3 «Результаты и их обсуждение» содержит шесть разделов и описывает результаты проведенного диссертантом исследования. Получение ИПСК интеграционным и неинтеграционным методами от пациентов с болезнью Паркинсона и их характеристика описаны внятно и детально. Автором выполнено сравнительное исследование метиломов изогенных линий ИПСК, полученных различными методами. Детально описан и обсужден протокол дифференцировки ИПСК человека в постмитотические тирозингидроксилаза-положительные нейроны. Проведена подробная характеристика полученных от здоровых доноров и пациентов с болезнью Паркинсона популяций дифференцированных из ИПСК клеток по экспрессии ряда нейральных и нейрональных маркеров. Представленные иллюстрации подтверждают высокий уровень выполненного исследования. Приведены данные полногеномного анализа транскриптомов дифференцированных из ИПСК клеток здорового донора и пациентов с болезнью Паркинсона. К достоинствам работы следует отнести разнообразие методических подходов, реализованных в том числе и в сотрудничестве с другими лабораториями (ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России, Институт Восточной Финляндии г. Куопио).

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**:

1. Диссертация читалась бы много проще, если бы автор сделал список сокращений. Сокращения, не всегда расшифровываются в момент первого упоминания, что затрудняет восприятие текста.
2. В главе «Обзор литературы» автор перечисляет разные способы получения ИПСК, однако почему то не упоминает использование для этих целей микроРНК.
3. В этой же главе встречаются описки, неточности и неудачные фразы, например, «имеют в своих промоторных областях группы повторяющихся нуклеотидов С и G, получившие название CpG островков» и т.д..
4. В главе «Материалы и методы» список реактивов приведен без каталожных номеров, поэтому трудно понять какими именно реактивами пользовался автор. Справедливости ради надо отметить, что каталожные номера встречаются в тексте главы, но далеко не все.
5. В главе перечислены далеко не все праймеры, нет данных о длине ПЦР-продуктов (это все можно было внести в таблицы), что временами осложняет понимание текста.
6. В этой же главе имело бы смысл более детально описать биоинформационные методы, нормализацию данных, используемые поправки и т.д..
7. В главе «Результаты и их обсуждение» автор мог бы более предметно проанализировать полногеномные данные по метилированию ДНК, и более детально проанализировать данные транскриптомного исследования учитывая функции мутантных генов или метаболических путей, в которые они вовлечены.

В целом диссертационная работа Лебедевой О.С. выполнена на высоком научном и методическом уровне, представляет собой объемное и разностороннее исследование, выполненное на высочайшем методологическом уровне, и предъявляемые замечания никак не умаляют научной значимости проделанной работы.

Заключение

Содержание работы полностью отражено в 7 статьях, которые опубликованы в журналах, соответствующих Перечню ВАК России для опубликования основных научных результатов диссертации. Автором опубликовано 5 статей в изданиях, не входящих в Перечень ВАК России. Полученные автором данные представлены в виде докладов на 7 международных конференциях.

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 учеными, а также медицинскими клиническими учреждениями.

Автореферат диссертации полностью отражает основное содержание диссертации. Таким образом, диссертация Лебедевой Ольги Сергеевны «Создание модельной системы для изучения функции генов, ассоциированных с болезнью Паркинсона, с использованием технологии генетического репрограммирования» 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 полностью отвечает требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, предъявляемым к кандидатским диссертациям; а ее автор Лебедева Ольга Сергеевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика (биологические науки).

Отзыв на диссертационную работу Лебедевой О.С. «Создание модельной системы для изучения функции генов, ассоциированных с болезнью Паркинсона, с использованием технологии генетического репрограммирования» рассмотрен, обсужден и одобрен на ученом совете ИХБФМ СО РАН (единогласно) 10 октября 2016 года, протокол №9.

Отзыв составлен 10 октября 2016 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-т акад. Лаврентьева, 8, Телефон: (383) 363-51-50, E-mail: kms@niboch.nsc.ru, lakt@list.ru (Лактионов П.П.). <http://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