

## ОТЗЫВ

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

Болезнь Паркинсона является тяжелым нейродегенеративным заболеванием, развивающимся в результате гибели дофаминергических нейронов черной субстанции и, как правило, проявляющимся у пациентов преклонного возраста. В настоящее время нет способов эффективного лечения этого заболевания, и все используемые подходы обеспечивают только симптоматическое лечение и могут только замедлить развитие этого заболевания. По всей видимости, это обусловлено тем, что до сих пор не выяснены молекулярно-биологические причины возникновения этого заболевания и поэтому остается не вполне понятным, каким образом можно приостановить гибель дофаминергических нейронов. Для того чтобы разработать эффективные методы лечения болезни Паркинсона крайне желательно иметь клеточную модель, на которой можно было бы проводить биохимические и электрофизиологические эксперименты, а также тестировать различные фармакологические препараты. Создание такой модели позволило бы более подробно и детально охарактеризовать изменения, происходящие в метаболизме клеток при болезни Паркинсона, и выявить основные процессы, воздействие на которые позволило бы приостановить развитие патологического процесса. Диссертационная работа О.С. Лебедевой посвящена в высшей степени актуальной и сложной проблеме использования культур клеток, полученных из индуцированных плюрипотентных клеток здоровых людей и пациентов, страдающих болезнью Паркинсона, и дифференцированных в нейрональном направлении для изучения процессов патогенеза этого заболевания.

Перед диссертантом стояло несколько взаимосвязанных задач. Во-первых, было необходимо получить фибробласты кожи здоровых людей и пациентов, страдающих болезнью Паркинсона и перепрограммировать их в плюрипотентные клетки. Во-вторых, плюрипотентные клетки было необходимо дифференцировать и добиться получения культуры тирозин-гидроксилаза-положительных постмитотических нейронов. Наконец, в-третьих, было необходимо провести сравнение экспрессии различных генов в клетках, полученных от здоровых людей и от пациентов, страдающих болезнью Паркинсона. Для решения каждой из перечисленных проблем не было заранее известных гарантированных подходов и решение каждой следующей проблемы было возможным только после успешного преодоления трудностей предыдущего этапа исследований. К части диссертанта, он успешно справился со всеми поставленными задачами.

В начале своего исследования О.С. Лебедева осуществила репрограммирование фибробластов кожи в плюрипотентные клетки. Как уже отмечалось, при этом использовались фибробласты здоровых людей и пациентов, страдающих болезнью Паркинсона. Диссертант использовал как интеграционный, так и неинтеграционный методы репрограммирования фибробластов и убедительно показал, что оба метода обеспечивают одинаково успешное репрограммирование. Помимо этого было установлено, что полногеномный паттерн метилирования не зависит от метода репрограммирования и что как интеграционный, так и неинтеграционный методы могут быть использованы для получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, применимых для моделирования болезни Паркинсона. При выполнении этой части исследования было показано, что эффективность репрограммирования не зависит от того фибробласты здоровых или больных людей использовались в эксперименте. Мутации в генах *PARK2* и *PARK8* не сказывались на эффективности репрограммирования, и морфология клеток, полученных после репрограммирования клеток здоровых людей, не отличалась от морфологии клеток, полученных после репрограммирования фибробластов пациентов с болезнью Паркинсона.

Успешно решив задачи первого этапа исследований, О.С. Лебедева приступила к разработке эффективного и простого метода дифференцировки полученных плюрипотентных клеток в тирозингидроксилаза-положительные нейроны. Диссертант отказался от описанных в литературе методов дифференцировки и разработал собственный метод, обеспечивающий высокоэффективную дифференцировку плюрипотентных клеток. В ходе этого процесса более 80% клеток приобретали



морфологию нервных клеток и начинали синтезировать дофамин и специфические маркеры, такие как синаптофизин. Важно отметить, что разработанный диссертантом метод позволил с одинаковой эффективностью дифференцировать как клетки здоровых людей, так и клетки пациентов с болезнью Паркинсона. Кроме того, разработанный метод дифференцировки позволяет создавать банк клеток, находящихся на разных стадиях дифференцировки. Такие клетки можно хранить в замороженном состоянии и использовать по мере необходимости.

На заключительном этапе исследований О.С. Лебедева провела анализ дифференциальной экспрессии генов в клетках, полученных от пациентов с болезнью Паркинсона и от здоровых доноров. В случае здоровых доноров по мере культивирования сначала выявляется экспрессия генов, участвующих в клеточном цикле и митозе, затем генов, ответственных за передачу нервного импульса и рост нейронов и, наконец, на еще более поздних стадиях культивирования повышается экспрессия генов, участвующих в функционировании лизосом и фагосом. Аналогичные изменения паттерна экспрессируемых генов наблюдается и в случае клеток, полученных от пациентов с болезнью Паркинсона. Однако в этом случае повышенная экспрессия генов, участвующих в функционировании лизосом и фагосом, наблюдается на более ранних этапах культивирования.

Завершая анализ диссертационной работы О.С. Лебедевой, можно заключить, что работа посвящена в высшей степени актуальной проблеме, выполнена на высоком методическом уровне и содержит оригинальные экспериментальные данные. В ходе выполнения работы диссертант с успехом справился со сложными и крайне трудоемкими задачами и предложил оригинальные решения для ряда важных экспериментальных проблем. Судя по автореферату, диссертационная работа Ольги Сергеевны Лебедевой отвечает всем требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор, несомненно, заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 - генетика.

Член-корреспондент РАН,  
профессор кафедры биохимии  
биологического факультета МГУ,  
доктор биологических наук  
по специальности 03.01.04 биохимия



Николай Борисович Гусев

11 ноября 2016 года

Ленинские Горы дом 1 корп 12, Москва ГСП-1, 119234  
Контактный телефон: 7-495-939-2747  
E-mail: NBGusev@mail.ru

Биологический факультет Федерального Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Ленинские Горы дом 1 корп. 12, Москва ГСП-1, 119234  
Телефон: 939-27-76, Факс: 939-43-09  
e-mail: info@mail.bio.msu.ru

ПОДПИСЬ РУКИ Гусева Н.Б.  
ЗАВЕРЯЮ

Документовед биологического факультета МГУ

Почтовый адрес: Ленинские Горы дом 1 корп 12, Москва ГСП-1, 119234