

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 002.214.01 НА БАЗЕ
ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ НАУКИ
ИНСТИТУТА ОБЩЕЙ ГЕНЕТИКИ ИМ. Н.И. ВАВИЛОВА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ
НАУК ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ
КАНДИДАТА БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 01.12.2016 протокол № 12

О присуждении Лебедевой Ольге Сергеевне, гражданке РФ, ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Создание модельной системы для изучения функции генов, ассоциированных с болезнью Паркинсона, с использованием технологии генетического репрограммирования» по специальности 03.02.07 – генетика принята к защите «28» сентября 2016 г., протокол № 6, диссертационным советом Д 002.214.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук (ИОГен РАН), Москва, 119991, ГСП-1, ул. Губкина, д. 3, приказ Минобрнауки РФ № 105/нк от 11.04.2012 г.

Соискатель Лебедева Ольга Сергеевна, 1988 года рождения, в 2009 году с отличием окончила Биологический факультет Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» по специальности биохимия

В 2012 году Лебедева О.С. окончила очную аспирантуру Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной генетики Российской академии наук; работает в должности младшего научного сотрудника в том же учреждении (с 2015 г. как совместитель), с 2015 года работает также в должности младшего научного сотрудника в Федеральном государственном бюджетном учреждении Федеральном научно-клиническом центре физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства России.

Диссертация выполнена в лаборатории генетики развития в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук и в лаборатории молекулярной генетики соматических клеток Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной генетики Российской академии наук.

научные руководители: д.б.н., проф. Гривенников И.А. – зав. лаб. молекулярной генетики соматической клетки Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной генетики Российской академии наук и д.б.н. Лагарькова М.А. – зав. лаб. клеточной биологии Федерального государственного бюджетного учреждения Федерального научно-клинического центра физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства.

Официальные оппоненты: Стрельников В.В. – д.б.н. (специальность 03.02.07 – генетика), доцент, зав. лаб. эпигенетики Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Медико-генетический научный центр» и Воротеляк Е.А. – д.б.н. (специальность 03.03.04. - клеточная биология, цитология, гистология), ио зав. лаб. клеточной биологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии развития им. Н.К. Кольцова Российской академии наук, дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация - Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (ИХБФМ СО РАН) в своем положительном заключении, подписанным Лактионовым П.П., к.б.н., зав. лаб. молекулярной медицины и Рыковой Е.Ю., д.б.н., ст. науч. сотр. лаб. молекулярной медицины, указали, что по своему содержанию, уровню выполнения научных исследований, научной новизне и практической значимости полученных результатов диссертация соответствует заявленной специальности и полностью отвечает требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24 сентября 2013 г., предъявляемым к кандидатским диссертациям.

Соискатель имеет 12 опубликованных научных работ по теме диссертации. Работ, опубликованных в рецензируемых научных изданиях – 7; в материалах российских и международных конференций – 8. Наиболее значительные публикации: 1) **Лебедева О.С.**, Лагарькова М.А., Киселев С.Л., Мухина И.В., Ведунова М.В., Усова О.В., Ставровская А.В., Ямщикова Н.Г., Федотова Е.Ю., Гривенников И.А., Хаспеков Л.Г., Иллариошкин С.Н. Морфофункциональные свойства индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, полученных из фибробластов кожи человека и дифференцированных в дофаминергические нейроны. // Нейрохимия. – 2013.

– Т. 3. – С. 233-241. 2) **Лебедева О.С.**, Лагарькова М.А., Иллариошкин С.Н., Хаспеков Л.Г., Гривенников И.А. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки: новые возможности в нейробиологии и нейротрансплантологии. // *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*. – 2011. - Т. 5. - №4. - С. 37-45. 3) Nekrasov E.D., Vigont V.A., Klyushnikov S.A., **Lebedeva O.S.**, Vassina E.M., Bogomazova A.N., Chestkov I.V., Semashko T.A., Kiseleva E., Sulдина L.A., Bobrovsky P.A., Zimina O.A., Ryazantseva M.A., Skopin A.Yu., Illarioshkin S.N., Kaznacheeva E.V., Lagarkova M.A., Kiselev S.L. Manifestation of Huntington's disease pathology in human induced pluripotent stemcell-derived neurons // *Mol. Neurodegener.* - 2016. - V. 11. - № 1. - P. 27-42.

На диссертацию и автореферат отзывы прислали: 1.Бутенко Г.М., д.м.н., проф., чл.-корр. НАН Украины, академик НАМН Украины, чл.-корр. РАН, директор ГУ «ИГРМ НАМН», г. Киев, Украина; 2.Гусев Н.Б., д.б.н., чл.-корр. РАН, зав. каф. биохимии биологического факультета МГУ, г. Москва; 3.Лазарев В.Н., д.б.н., доцент, зав. лаб. геномной инженерии ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России, г. Москва; 4.Зеркаленкова Е.А., к.б.н., науч. сотр. лаб. цитогенетики и молекулярной генетики ФГБУ ФНКЦ Детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева Минздрава РФ, г. Москва. Все отзывы положительные, критические замечания отсутствуют.

Выбор официальных оппонентов определялся их большим опытом работы в области геномных, молекулярно-генетических исследований и исследований в области биологии стволовых клеток, а также изучении наследственных заболеваний человека.

Выбор ведущей организации обосновывается высоким уровнем проводимых в ней исследований в области молекулярной биологии, геномики, системной биологии, биоинформатики, молекулярной и общей генетики, механизмов реализации генетической информации и клеточной биологии.

Диссертационный совет отмечает, что в результате выполненных соискателем исследований: впервые в России были получены линии пациент-специфичных ИПСК, несущие мутации в генах *PARK2* и *PARK8*; изучено влияние интеграционного и неинтеграционного методов репрограммирования фибробластов человека на метилирование ДНК на полногеномном уровне; проведенный анализ впервые продемонстрировал

отсутствие достоверных различий между способами доставки репрограммирующих факторов в фибробласты кожи человека. Разработан эффективный и воспроизводимый протокол нейрональной дифференцировки ИПСК, который позволяет получать культуру постмитотических нейронов, более чем на 80% состоящую из (ТН) - положительных клеток. При анализе транскриптома ТН-положительных нейронов, дифференцированных из ИПСК, были показаны специфические для генов *PARK2* и *PARK8* различия в таких клеточных процессах, как развитие нейронов, синтез нейромедиаторов, функционирование фагосом и лизосом, деление клетки и клеточный цикл, функционирование митохондрий, гликолиз. Таким образом, впервые разработаны системы для изучения функции генов *PARK2* и *PARK8*, позволяющие моделировать развитие патогенеза БП *in vitro*.

Теоретическая значимость исследования: полученные из ИПСК пациент-специфичные нейроны на транскриптомном уровне проявляют мутантный фенотип *in vitro*. Таким образом, создана модельная система, позволяющая изучать особенности патологии с помощью различных методов молекулярной биологии, клеточной биологии и генетики, в том числе и полногеномных.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики: разработанный протокол дифференцировки ИПСК пациентов наследственными формами болезни Паркинсона и здоровых доноров, позволяет получать культуры, на 70-90% состоящие из ТН - положительных клеток. Высокий процент ТН - положительных клеток и наличие в клетках мутаций, связанных с развитием БП, делают полученные культуры нейронов удобной модельной системой для изучения молекулярных и клеточных механизмов развития заболевания, а также для скрининга потенциальных лекарственных препаратов. Разработанная методика дифференцировки и ее модификации являются предметом патентной заявки. Простота и воспроизводимость протоколов цитофлуориметрического анализа позволяет широко использовать их в клинической практике персоналом любой квалификации. Технология получения ИПСК неинтеграционным методом в будущем может быть использована в целях клеточной терапии различных заболеваний человека.

Оценка достоверности результатов исследования: результаты получены с использованием современных методов культивирования клеток человека, методов введения в клетки трансгенов с использованием

лентивирусных векторов последнего поколения и векторов на основе вируса Сендай, методов иммуоцитохимического окрашивания GTG-дифференциального окрашивания, метода ПЦР, сопряженной с обратной транскрипцией, методов анализа экспрессии генов с использованием ДНК-микрочипов и биоинформационных методов анализа данных, методов проточной цитометрии и других. Автором показана воспроизводимость результатов в биологических повторностях, в экспериментах были использованы положительные и отрицательные контроли, ключевые результаты были продемонстрированы различными методами. Результаты диссертационной работы согласуются с результатами, представленными в независимых источниках по данной тематике.

Личный склад соискателя заключается в участии на всех этапах выполнения работы, а именно: в получении и характеристике ИПСК от пациентов с болезнью Паркинсона и здоровых доноров, разработке эффективного протокола дифференцировки ИПСК в постмитотические дофаминергические нейроны, изучении нейронов методами иммуоцитохимии и ПЦР, подготовке проб для полногеномного исследования метилирования ДНК, обсчете данных полногеномного транскриптомного исследования, оценке эффективности дифференцировки ИПСК в дофаминергические нейроны методом проточной цитофлуориметрии. Автор лично проводил обработку полученных результатов и оформлял результаты для представления в виде тезисов и докладов на конференциях, а также принимал участие в написании и опубликовании статей по результатам работы.

Диссертация соответствует критериям, установленным «Положением о присуждении ученых степеней» №842 от 24 сентября 2013 г. На заседании 1 декабря 2016 года диссертационный совет принял решение присудить Лебедевой Ольге Сергеевне ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 17 человек, из них 16 докторов наук, участвовавших в заседании, из 22 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за – 17, против – нет, недействительных бюллетеней – нет

Председатель диссовета

Захаров-Гезехус Илья Артемьевич

Ученый секретарь диссовета

Синельщикова Татьяна Аркадьевна

«5» декабря 2016 г.

