

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Маланхановой Туяны Баировны
«Создание и характеристика клеточной модели болезни Хантингтона»
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 03.03.04 – «клеточная биология, цитология, гистология»

Актуальность темы диссертации

Успехи борьбы с инфекционными, онкологическими и сердечно-сосудистыми заболеваниями заставляют по-новому взглянуть на нейродегенеративные заболевания, которым до недавнего времени уделяли недостаточно внимания, как в области фундаментальных исследований, так и в практическом ключе. Одной из тяжелых нейродегенеративных патологий является болезнь Хантингтона. В результате развития этого заболевания срединные шипиковые нейроны (СШН) стриатума гибнут, а потеря СШН приводит к двигательным дисфункциям, когнитивным расстройствам и, в конечном счете, смерти пациента. В последние годы различными группами исследователей предпринимались попытки создания клеточной модели этой патологии. Биологически достоверная модель болезни Хантингтона позволит, во-первых, лучше понять молекулярные механизмы прогрессии этой патологии, во-вторых, начать масштабный поиск кандидатных терапевтических средств. В связи с этим, диссертация Туяны Баировны Маланхановой, посвящённая созданию клеточной модели болезни Хантингтона, выглядит крайне актуальной.

Новизна проведённых исследований и полученных результатов

Перед Туяной Баировной стояла непростая задача создать модель болезни Хантингтона, максимально достоверную, и, в то же время, удобную для дальнейших работ. Одним из важнейших критериев достоверности клеточных моделей является наличие изогенного контроля, который позволяет точно оценивать вклад мутантного генотипа в наблюдаемые эффекты. В своей работе

Туяна Баировна пошла по пути использования фибробластов здорового донора в качестве исходного материала. Далее ей были получены моноклональные дериваты фибробластов с мутациями в гене *HTT*. Чтобы получить такие мутации, Туяна Баировна с использованием платформы CRISPR/Cas9 разработала систему внесения мутаций, которую она предварительно отладила на клетках 293T. Мутантные по гену *HTT* фибробласты и изогенный контроль были затем переведены Туяной Баировной в ИПСК (индуцированные плюрипотентные стволовые клетки). Полученные ИПСК были затем дифференцированы в СШН, а достоверность дифференцировки Туяна Баировна подтвердила как фенотипированием, так и функциональными тестами. Очевидно, что для проведения всех этих экспериментов потребовалось использование новейших методов клеточной и молекулярной биологии. Не вызывает никакого сомнения новизна проведенных исследований и полученных результатов.

Степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов, рекомендаций и заключений.

Работа Туяны Баировны выполнена на высоком методическом уровне. Принципиальная особенность представленной работы это наличие изогенного контроля. Благодаря этому Туяна Баировна может с полным основанием утверждать, что наблюдаемые ей фенотипические и функциональные проявления отклонений в СШН (нарушенное формирование нейральных розеток, высокая чувствительность к удалению трофических факторов и сниженный уровень N-кадгерина на стадии предшественников СШН, ультраструктурные нарушения терминально дифференцированных СШН) связаны именно с мутационными событиями в гене *HTT*. Постановка экспериментов в парах генетически модифицированные клетки — изогенный контроль позволяет утверждать, что научные положения и выводы вполне обоснованы. Необходимо отметить, что Туяна Баировна характеризовала

полученные ИПСК, а позже и дифференцированные в СШН клетки при помощи различных методов, измеряя как уровни мРНК генов *ARPP21*, *CALB1*, *FOXP2*, *DRD1*, *DRD2* и др., так и детектируя ГАМК и маркерные белки MAP2 и SYN1 при помощи иммунофлуоресцентного окрашивания.

Значимость результатов, полученных в диссертации, для науки и практики

Туяна Баировна отладила систему редактирования гена *HTT*, а затем, с помощью нее получила 23 клон эмбриональных фибробластов человека с мутацией в гене *HTT*. Далее два клон 2D12 (69Q/20Q) и 3D8 (53Q/40Q) были перепрограммированы к плюрипотентному состоянию с использованием эписомных векторов, в результате чего было получено 11 и 2 линии ИПСК соответственно. Туяна Баировна показала, что полученные линии ИПСК экспрессируют основные маркеры плюрипотентных клеток, при спонтанной дифференцировке в эмбриоидных тельцах образуют типы клеток трех примитивных зародышевых листков и имеют кариотип близкий к норме. Далее, в результате направленной дифференцировки ИПСК с мутацией в гене *HTT* Туяной Баировной были получены нейроны, экспрессирующие гены-маркеры СШН стриатума, такие как *GAD1*, *ARPP21*, *FOXP2*, *DRD1*, *DRD2* и *CALB1*. В заключение работы Туяна Баировна изучила мутантные клетки и обнаружила, что они демонстрируют патологический фенотип, наблюдающийся при БХ: нарушенное формирование нейральных розеток, высокая чувствительность к удалению трофических факторов и сниженный уровень N-кадгерина на стадии предшественников СШН, ультраструктурные нарушения терминально дифференцированных СШН. Полученные Туяной Баировной результаты представляют особенный интерес и значимость, так как такая модельная система СШН с мутацией *HTT* имеет полностью идентичный изогенный контроль.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

Результаты и выводы диссертационного исследования представляют интерес как для фундаментальной науки, так и для трансляционных исследований. Полученная Туяной Баировной модель может быть использована для изучения патогенеза болезни Хантингтона на молекулярном уровне, но, в первую очередь, эта модель представляет особенную ценность для проведения высокопроизводительного скрининга новых веществ, обладающих способностью останавливать патогенез болезни Хантингтона. Подобные исследования могут проводиться как исследовательскими учреждениями, так и фармкомпаниями в РФ и за рубежом.

Оценивая содержание диссертации в целом, нужно отметить хороший научный стиль изложения, и прекрасный иллюстративный материал. Диссертация построена по классической схеме, содержит 118 страниц текста, 21 рисунок и 214 источников литературы. Во введении Туяна Баировна представляет актуальность проблемы, ставит цель и описывает задачи исследования. Обзор литературы может быть условно разделен на две части — изложение сведений о молекулярных механизмах болезни Хантингтона и обзор платформы CRISPR/Cas9, которую затем автор использует для работы. Глава «Материалы и методы» содержит детальное описание экспериментальных процедур, изложение построено таким образом, что все эксперименты могут быть воспроизведены. Глава «Результаты и обсуждение» позволяет хорошо отследить ход экспериментов, и служит хорошей основой для выводов диссертации.

Аннотация диссертации оформлен в соответствии с общепринятыми требованиями, соответствует ее содержанию и дает полное представление об основных положениях работы.

На мой взгляд работа Туяны Баировны выиграла бы от более подробного обсуждения возможного применения полученной клеточной модели в системах скрининга кандидатных веществ для терапии болезни Хантингтона. Кроме того, плюсом было бы более детальное сопоставление результатов работы с имеющимися в этой области литературными данными. Указанные недостатки, однако, ни в коем случае не снижают ценность диссертационной работы Туяны Баировны.

Заключение

Считаю, что диссертация Маланхановой Туяны Баировны «Создание и характеристика клеточной модели болезни Хантингтона» полностью соответствует паспорту научной специальности 03.03.04 – «клеточная биология, цитология, гистология»: п. 2. «Изучение закономерностей дифференцировки клеток и тканей, их физиологической регенерации и регуляции этих процессов, а также дифференцировки и жизнедеятельности недифференцированных клеток», п. 6. «Молекулярные, иммунологические и физиологические аспекты изучения клеток ... в норме и патологии», п. 7 «Разработка экспериментальных моделей».

Диссертация Маланхановой Туяны Баировны «Создание и характеристика клеточной модели болезни Хантингтона», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, является продуманной и законченной научно-квалификационной работой. По новизне, научной и практической ценности полученных результатов диссертация полностью соответствует требованиям «Положения о присуждении учёных степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г. (в редакции постановлений Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 г. № 335, от 02 августа 2016 г. № 748, от 29 мая 2017 г. № 650, от 28 августа 2017 г. № 1024 и от 01 октября 2018 г. № 1168), предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени кандидата наук, а её автор – Маланханова Туяна Баировна - заслуживает присуждения учёной степени

кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – «клеточная биология, цитология, гистология».

Официальный оппонент:

старший научный сотрудник
лаборатории иммуногенетики
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Институт молекулярной и клеточной биологии
Сибирского отделения Российской академии
наук (ИМКБ СО РАН),
кандидат биологических наук



Кулемзин Сергей Викторович

630090

город Новосибирск

проспект Академика Лаврентьева д. 8/2

тел: +7383-363-90-72, e-mail: skulemzin@mcb.nsc.ru

Подпись С. В. Кулемзина заверяю:

ученый секретарь ИМКБ СО РАН

к.б.н.,



Л.Г. Ахмерова