

## 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

Диссертация Т.Б. Маланхановой посвящена разработке новой модели болезни Хантингтона *in vitro*, в основе которой – изогенная линия индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека (иПСК). Интерес к применению технологии репрограммирования соматических клеток человека для получения иПСК, возникший в последние годы, связан с новыми возможностями, открывающимися для исследователей: 1) получение персонафицированных моделей заболевания; 2) создание высокоэффективных систем *in vitro* для тестирования потенциальных лекарств-кандидатов; 3) применение иПСК для восстановления поврежденных тканей. В контексте цели диссертационного исследования Т.Б. Маланхановой этой интерес фокусируется на создании линии клеток, воспроизводящей характерные для хронической нейродегенерации изменения, с последующей дифференцировкой полученных клеток до шипиковых нейронов стриатума. Автор остановил свой выбор на использовании технологии геномного редактирования CRISPR/Cas9 для модификации гена, кодирующего хантингтин (НТТ). Выбор этой мишени для индукции специфического для болезни Хантингтона фенотипа не удивителен, так как этот вариант хронической нейродегенерации, с одной стороны, хорошо охарактеризован с точки зрения генетических механизмов (мультипликация триплетов CAG в первом экзоне гена НТТ, приводящая к продукции аберрантного белка хантингтина, нарушающего функциональную активность клеток головного мозга и изменяющего регуляцию внутриклеточного транспорта везикул, сборки белков цитоскелета), с другой стороны, его патогенез и возможности эффективной терапии вызывают



много вопросов. Важным и актуальным моментом в развитии этого направления исследований является создание т.н. изогенных линий клеток (с одинаковым генетическим «фоном» и наличием специфической мутации в определенном гене, ответственной за фенотипические проявления заболевания). Преимуществом этого подхода является то, что исходная линия, используемая для создания изогенной линии, автоматически становится адекватным контролем при достижении требуемой генетической модификации и воспроизведении патологического фенотипа. Это существенно расширяет спектр исследовательских возможностей и повышает их доказательность при работе с изогенными клеточными линиями.

Таким образом, диссертационное исследование Т.Б. Маланхановой является актуальным и перспективным, лежит в русле современным тенденций в развитии клеточной биологии.

### **Новизна проведенных исследований и полученных результатов**

Использование современных методов клеточной биологии, молекулярной генетики, геномного редактирования, визуализации позволило автору получить экспериментальные результаты, обладающие несомненной новизной. Фактически, автор совместил две самых современных технологии – получение иПСК и протокол CRISPR/Cas9 – для достижения цели исследования, причем это было выполнено нестандартным образом.

Т.Б. Маланхановой была впервые получена оригинальная клеточная линия, моделирующая болезнь Хантингтона, на основе линий иПСК с CAG-повторами в экзоне I гена HTT. Примечательно, что последовательное применение двух экспериментальных стратегий – внесение мутаций в эмбриональные фибробласты и последующее репрограммирование клеток – явилось интересным авторским подходом к работе с труднотрансфецируемыми иПСК, имеющими, к тому же, низкую активность системы гомологичной рекомбинации. Выполненный автором подбор сайта



для действия системы CRISPR/Cas9 и внесение синонимичной однонуклеотидной замены в последовательность донорной матрицы обеспечили максимально специфическую модификацию целевой последовательности ДНК. Примененный экспериментальный подход позволил получить изогенную линию iPSC с мутацией в HTT, а также «здоровый» изогенный контроль.

Далее автором была выполнена дифференцировка полученных линий до нейрональных клеток и обнаружены новые ультраструктурные изменения в мутантных нейронах, дополняющие существующие представления о молекулярном патогенезе болезни Хантингтона. Дифференцировка была достигнута путем применения нескольких протоколов, результатом чего стало получение шипиковых нейронов стриатума, оценка экспрессионного профиля которых подтвердила достижение цели этого этапа работы. Примечательно, что автором получены новые данные об ультраструктурных изменениях митохондрий (крупные и разветвленные митохондрии) в аффецированных нейронах, что может стать важным обоснованием развития нового направления в изучении молекулярного патогенеза болезни Хантингтона, связанного с aberrантной митохондриальной динамикой. Автору удалось получить данные, позволяющие, с определенной долей вероятности, зафиксировать стадию развития патологии нейронов стриатума при болезни Хантингтона (удлиненные шипики, соответствующие периоду пролиферативных изменений, маркируют предегенеративную стадию развития заболевания).

Важным, с точки зрения получения новых данных о роли aberrантного хантингина, стали эксперименты по оценке нейрогенного потенциала клеток *in vitro*, их чувствительности к депривации факторов роста и эффективности клеточной адгезии *in vitro* в сравнении с изогенным контролем. Полученные автором новые результаты не только подтверждают эффективность выбранного подхода к созданию адекватной клеточной модели заболевания,



но и дополняют существующие представления о механизмах нейродегенерации при болезни Хантингтона.

Считаю, что к наиболее интересным и перспективным для дальнейшего исследования и внедрения в практику находкам автора следует отнести: 1) создание новой модельной клеточной системы, воспроизводящей специфический генотип и фенотип при болезни Хантингтона за счет использования технологии CRISPR/Cas9 и иПСК; 2) применение оригинального экспериментального подхода, позволяющего обеспечить специфический гидролиз целевой последовательности геномной ДНК; 3) идентификация ультраструктурных изменений в клетках при экспериментальной болезни Хантингтона (нарушение структуры митохондрий); 4) комплексная характеристика экспрессионного профиля, чувствительности к депривации ростового фактора полученных клеточных линий.

В целом, диссертационное исследование Т.Б. Маланхановой обладает несомненной научной новизной, как в контексте методологии работы, так и по полученным результатам.

#### **Степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов, рекомендаций и заключений**

Обоснованность основных положений, выводов и практических рекомендаций, сформулированных в работе, обусловлена высоким методическим уровнем исследования (автор успешно применил два экспериментальных подхода – генетическое репрограммирование и геномное редактирование), достаточным объемом выполненных исследований, их грамотным планированием и анализом, хорошим уровнем обработки и интерпретации полученных данных. Так, в частности, на каждом этапе исследования автором были выполнены эксперименты, подтверждающие чистоту полученных результатов (например, оценка выраженности



нецелевой активности системы CRISPR/Cas9 в фибробластах путем секвенирования нецелых сайтов в геноме клеточных линий; полная характеристика iPСК с мутацией в гене HTT с оценкой экспрессии ключевых генов плюрипотентных стволовых клеток), что придает полученным данным дополнительную обоснованность и достоверность. Считаю важным отметить то, что автор проявляет способность критически анализировать свои результаты, в частности, касающиеся отсутствия обнаружения полиQ- или хантингтин-иммунопозитивных комплексов в нейронах, дифференцированных из изогенных iPСК, что дополнительно актуализирует необходимость разработки новых клеточных модельных систем, воспроизводящих различные компоненты сложного патогенеза этого нейродегенеративного заболевания.

В целом, уровень проектирования экспериментов и анализа результатов, современность и комплексность заявленного экспериментального подхода подтверждают то, что в диссертации Т.Б. Маланхановой представлены достоверные и обоснованные результаты и выводы. Положения, выносимые на защиту, выводы полностью соответствуют полученным результатам, свидетельствуют о достижении цели и решении всех заявленных в работе задач. Результаты исследования представлены на российских и международных конференциях, опубликованы в ведущих российских и международных профильных журналах, в том числе высокорейтинговых изданиях, входящих в Перечень ВАК РФ и индексируемых в международных базах данных Web of Science/Scopus..

### **Значимость результатов, полученных в диссертации, для науки и практики**

Значимость полученных результатов диссертационного исследования для фундаментальной науки (клеточная биология, молекулярная биология, патологическая физиология, нейробиология) определяется тем, что автором:

- 1) предложены новые экспериментальные подходы к созданию и



характеристике модельной системы на основе изогенных линий иПСК при болезни Хантингтона; 2) осуществлена комплексная оценка фенотипических проявлений заболевания на клеточном и субклеточном уровнях, позволяющая признать обоснованным применение предложенной стратегии для получения клеток, адекватно воспроизводящий патологический фенотип; 3) протестированы новые возможности для достижения специфического гидролиза геномной ДНК при применении системы CRISPR/Cas9; 4) идентифицированы новые ультраструктурные изменения в нейронах стриатума при болезни Хантингтона.

Значимость полученных результатов диссертационного исследования для практической деятельности (неврология, нейрофармакология) определяется тем, что полученная модельная система может быть использована при получении персонафицированных моделей заболевания, поиска новых механизмов патогенеза и тестирования лекарств-кандидатов.

В совокупности это дает право говорить об успешном достижении цели и решении задач исследования, о высокой значимости его результатов для науки и клинической практики.

### **Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы**

Результаты диссертационного исследования Т.Б. Маланхановой могут быть рекомендованы к использованию в следующих областях: 1) клеточная биология, молекулярная биология, цитология, молекулярная генетика (при планировании и проведении работ по геномному редактированию и получению новых клеточных линий с заданными свойствами); 2) в фармакологии (при тестировании лекарств-кандидатов в системах *in vitro*); 3) в нейробиологии и биоинженерии (при создании мультиклеточных ансамблей, например, моделей гематоэнцефалического барьера или моделей головного мозга в формате “brain-on-chip” с использованием иПСК); 4) в



высшем профессиональном образовании в области биологии и медицины. Все указанные направления могут быть реализованы в университетах и академических научных центрах Российской Федерации.

**Оценивая содержание диссертации в целом,** считаю необходимым отметить, что работа написана в академическом стиле, грамотно, логично. Текст хорошо структурирован и иллюстрирован. Стил ь написания работы подтверждает то, что автор хорошо владеет методологией исследования, обсуждает проблемы с различных точек зрения, грамотно обращается к литературным данным для интерпретации собственных результатов.

Диссертация изложена на 118 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и обсуждения, выводов, заключения, списка литературы. Последний состоит из 214 источников, преимущественно из зарубежных журналов, значительная часть которых опубликована в течение последних 5-7 лет. Диссертация содержит 3 таблицы и 21 рисунок, иллюстрации выполнены аккуратно, они разнообразны по способу представления данных и точно отражают полученные автором результаты.

Во введении автором представлены основные положения, касающиеся актуальности, цели, задач выполнения работы, ее научной новизны и практической значимости, охарактеризованы степень апробации полученных результатов и личный вклад соискателя в работу.

В обзоре литературы отражены современные представления о молекулярном патогенезе болезни Хантингтона, способах ее терапии, а также о технологиях геномного редактирования с использованием CRISPR/Cas9 системы и получения иПСК и их нейрональной дифференцировки. Считаю важным отметить, что автор в равной степени свободно оперирует терминами и данными, касающимися молекулярно-биологических и медицинских аспектов темы исследования, что подтверждает готовность



соискателя к выполнению серьезных междисциплинарных исследовательских проектов.

В главе «Материалы и методы исследования» автор детально описывает использованные им методы и протоколы подробно, с достаточной степенью детализации, описывает разнообразные современные методы исследования (молекулярно-генетические, клеточно-биологические, методы визуализации, а также методы статистического анализа полученных данных), комплексное применение которых позволило Т.Б. Маланхановой достичь цели исследования.

В главе «Результаты и обсуждение» автором изложены результаты диссертационного исследования, эта глава содержит подглавы, соответствующие решенным экспериментальным задачам. В этой главе автор в полной мере раскрывает свой потенциал исследователя, переходя от одной экспериментальной задаче к другой, анализируя полученные данные и критически их осмысливая. Именно в этом разделе работы сосредоточено наибольшее количество иллюстраций, выполненных на высоком уровне и существенно дополняющих текст. Считаю, что этот раздел работы, благодаря своей внутренней логике, адекватно отражает основные результаты исследования.

В главе «Заключение» автор четко формулирует свои основные экспериментальные находки. Выводы и практические рекомендации полностью соответствуют полученным результатам, заключение, сделанное автором, достаточно полно резюмирует основные результаты и их интерпретацию.

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

**При чтении работы возникли следующие замечания:** 1) легенды некоторых рисунков не совсем полны, например, легенды рисунка 13А и



рисунка 14 не содержат указания на масштаб и метод визуализации, а на рисунках 12А, 15Б, 16Б отсутствуют данные о достоверности отличий между группами; 2) в диссертации не хватает общей схемы дизайна исследования в главе «Материалы и методы», а также итоговой резюмирующей схемы, иллюстрирующей общие характеристики полученных изогенных линий, в обсуждении результатов. Однако все указанные замечания не носят принципиального характера и не влияют на общее положительное впечатление от работы.

Предлагаю автору следующие **вопросы в формате научной дискуссии** по проблематике работы:

1) Известно, что число CAG-повторов в мутантных клетках при болезни Хантингтона может увеличиваться в течение жизни человека. Как, с использованием предлагаемой автором методологии, возможно учесть такие изменения и управлять ими? Не является ли в таком контексте применение iPСК, теряющих «возрастные» эпигенетические модификации, определенным препятствием в создании адекватных клеточных моделей болезни Хантингтона?

2) С учетом того, что хантингтин выполняет различные физиологические функции в здоровых нейронах, будучи, например, ответственным, за развитие клеток, можно ли использовать разработанную автором изогенную линию для идентификации новых физиологических функций хантингтина, в том числе, например, в контексте его взаимодействия с другими клеточными белками?

3) Имеются ли данные о сохранности или изменении физиологической функции хантингтина в iPСК и по мере их дифференцировки в клетки нейрональной природы, в том числе, например, с учетом изменения экспрессии p53 и подавления DDR (DNA-damage response) в iPСК при болезни Хантингтона, что, несомненно, может существенно влиять на жизнеспособность и формирующийся фенотип клеток?



4) Какие, по мнению автора, проблемы в создании и применении изогенных линий клеток наиболее актуальны в настоящее время, какие пути их решения представляются автору наиболее перспективными?

### **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 законченной, самостоятельной научно-квалификационной работой, которая вносит значительный вклад в развитие клеточной биологии, цитологии, содержит решение актуальной научной задачи создания новых современных экспериментальных клеточных моделей для идентификации молекулярных механизмов функционирования клеток в норме и при патологии. По новизне, научной и практической ценности полученных результатов диссертация полностью соответствует требованиям «Положения о присуждении ученых 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 ученой степени кандидата наук, а ее автор – Маланханова Туяна Баировна -



заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – «клеточная биология, цитология, гистология».

Официальный оппонент:

главный научный сотрудник и руководитель  
научно-исследовательского института  
молекулярной медицины и патобиохимии,  
заведующий кафедрой биологической химии  
с курсом медицинской, фармацевтической  
и токсикологической химии,  
проректор по инновационному развитию  
и международной деятельности  
ФГБОУ ВО «Красноярский государственный  
медицинский университет  
им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого  
Министерства здравоохранения РФ,  
доктор медицинских наук, профессор  
(специальность 14.03.03 – патологическая  
физиология, медицинские науки)

Алла Борисовна Салмина

660022, Российская Федерация, Красноярский край, г. Красноярск,  
ул. Партизана Железняка, дом 1,  
тел.: 8(391)2280769, 8(391)2201071; 8(391)2201395  
e-mail: allasalmina@mail.ru ; rector@krasgmu.ru

« 20 » января 2020 г.

Подпись А.Б. Салминой заверяю:

Ученый секретарь  
ФГБОУ ВО КрасГМУ  
им. проф. В.Ф.Войно-Ясенецкого  
Минздрава России,  
д.м.н., профессор



Н.Н. Медведева