

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Устьянцевой Елизаветы Ивановны
«Создание и функциональный анализ
клеточной модели бокового
амиотрофического склероза с помощью
генетически-кодируемых биосенсоров»
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по
специальности «клеточная биология, цитология, гистология» - 03.03.04

Актуальность темы диссертации

Боковой амиотрофический склероз (БАС) — это достаточно распространённое нейродегенеративное заболевание. Типичное проявление БАС на клеточном уровне это дегенерация центральных и периферических моторных нейронов, которая приводит к постепенной утрате контроля над мышцами. Пациенты с БАС по этой причине страдают от когнитивных нарушений и болевого синдрома, а терапевтические средства для контроля этого заболевания практически отсутствуют. Необходимо отметить, что не более 10% случаев БАС имеют явно подтверждённую генетическую природу, при этом известно не менее ста генов, мутации в которых запускают патологический процесс. Помимо сложной генетики БАС характеризуется и непростой картиной молекулярных изменений в метаболизме повреждённых нейронов. Одной из причин деградации нейронов может быть дисбаланс во внутриклеточной генерации свободных форм кислорода, при этом контроль этого параметра на живых клетках может эффективно осуществляться с использованием генетически-кодируемых биосенсоров.

Таким образом, представляется очевидной актуальность работы Елизаветы Ивановны, посвященной созданию клеточной модели бокового амиотрофического склероза и дальнейший анализ таких клеток при помощи генетически-кодируемых биосенсоров.

Новизна проведённых исследований и полученных результатов

Работы по созданию клеточных линий, моделирующих различные отклонения, являются особенно ценными, если представлен адекватный изогенный контроль. Елизавета Ивановна получила изогенные линии ИПСК, содержащие

однонуклеотидные замены в гене *SOD1*, при этом в ее распоряжении имеется и родительская линия без мутаций. Кроме того, на основе здоровых ИПСК, пациент-специфичных ИПСК и ИПСК с внесёнными заменами впервые Елизаветой Ивановной был получен ряд трансгенных линий, несущих встройку последовательностей биосенсоров перекиси водорода в цитоплазме и митохондриях. Все эти работы были проведены впервые и обладают значимой научной новизной.

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

Для решения задач исследования Елизавета Ивановна применила наиболее подходящие и современные методы клеточной и молекулярной биологии. Она получала ИПСК путём репрограммирования мононуклеарных клеток периферической крови; вносила замены в ген *SOD1* при помощи платформы CRISPR/Cas9, направлено дифференцировала ИПСК в моторные нейроны и исследовала функциональную активность последних при помощи широкого арсенала методов. Особенно ценно, что интеграцию последовательностей, кодирующих биосенсоры Елизавета Ивановна проводила в локус *AAVS1*. Интеграция последовательностей в этот участок ДНК по общему мнению не влияет на функциональную активность клетки, поэтому помимо экспрессии трансгенов такие линии не будут иметь значимых отличий.

Использование автором разнообразных и хорошо валидированных экспериментальных подходов позволяет уверенно утверждать, что полученные Елизаветой Ивановной данные достоверны, а сделанные выводы обоснованы.

Значимость результатов, полученных в диссертации, для науки и практики

Несмотря на значительный прогресс в терапии онкологических, инфекционных и сердечно-сосудистых заболеваний нейродегенеративные заболевания по большей части остаются некурабельными. Необходимость в создании средств терапии БАС очевидна, а модельные клеточные линии, созданные Елизаветой Ивановной могут позволить использовать высокопроизводительные методы скрининга соединений для поиска новых терапевтических агентов. Наличие в системе флуоресцентных биосенсоров перекиси водорода позволит в автоматическом

режиме исследовать баланс свободных форм кислорода в модельных клетках без использования дополнительных средств.

Помимо явной практической значимости, работы Елизаветы Ивановны имеет и фундаментальную ценность. Созданные ею линии могут быть использованы для изучения молекулярных механизмов патогенеза БАС, а также транскрипционного ландшафта в таких клетках под воздействием разнообразных стимулов.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

Полученные Елизаветой Ивановной результаты представляют практическую ценность и могут быть использованы для внедрения методов скрининга лекарственных соединений, обладающих активностью в отношении БАС.

Оценивая содержание диссертации в целом, в первую очередь нужно отметить разнообразие экспериментальных подходов, которые использовала Елизавета Ивановна в ходе выполнения своей работы. Структурно диссертация построена по классической схеме, во введении Елизавета Ивановна излагает суть научной проблемы и ставит задачи, которые необходимо решить. Обширный и хорошо иллюстрированный обзор литературы содержит имеющиеся сведения о патологических механизмах развития БАС; об использовании технологии CRISPR/Cas9 для моделирования патологических состояний и генной терапии, а также о генетически-кодируемых биосенсорах. Раздел «материалы и методы» содержит детальное описание всех экспериментальных процедур, а также последовательности олигонуклеотидов (приводятся в приложении 2). Раздел «результаты» содержит подробное изложение полученных результатов. Елизавета Ивановна показывает, что моторные нейроны, полученные из ИПСК с заменами D90A и G127R/K128X отличаются более низкой скоростью роста аксональных отростков по сравнению с контролем. Некоторой неожиданностью было сделанное Елизаветой Ивановной наблюдение, что флуоресцентные биосенсоры перекиси водорода в цитоплазме (Cyto-roGFP2-Orp1) моторных нейронов закономерно реагируют на добавление H₂O₂ в культуральную среду, в отличие от биосенсоров перекиси водорода в митохондриях (Mito-roGFP2-Orp1) моторных нейронов. Отдельной частью

работы был функциональный анализ полученных модельных клеток, который выявил, что моторные нейроны, полученные из ИПСК с заменой G127R/K128X в гене *SOD1*, демонстрируют повышение уровня перекиси водорода в цитоплазме и митохондриях по сравнению с контролем при культивации в полноценной среде и в условиях депривации питательных веществ.

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

В качестве небольшого замечания хочу отметить, что в целом качественно написанный раздел «Обсуждение», содержит недостаточно данных по сравнению полученных Елизаветой Ивановной линий и описанных в литературе клеточных моделей БАС. Кроме того, использование прилагательного «здоровые» в отношении линий клеток также не является общепринятым. Указанные незначительные недостатки не снижают ценности и значимости работы.

Заключение

Считаю, что диссертация Устьянцевой Елизаветы Ивановны «Создание и функциональный анализ клеточной модели бокового амиотрофического склероза с помощью генетически-кодируемых биосенсоров» полностью соответствует паспорту научной специальности «клеточная биология, цитология, гистология» - 03.03.04: п. 5. «Исследование адаптации тканевых элементов к действию различных биологических, физических, химических и других факторов»; п. 6. «Молекулярные, иммунологические и физиологические аспекты изучения клеток многоклеточных, малоклеточных и одноклеточных организмов в норме и патологии»; п. 7 «Разработка экспериментальных моделей, методов цитологической диагностики, морфометрии, маркерной гисто- и цитохимии и др.»

Диссертация Устьянцевой Елизаветы Ивановны «Создание и функциональный анализ клеточной модели бокового амиотрофического склероза с помощью генетически-кодируемых биосенсоров», 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, от 01 октября 2018 г. № 1168 и от 20 марта 2021 г. №426), предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени кандидата наук, а её автор – Устьянцева Елизавета Ивановна - 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

Института 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

