

## ОТЗЫВ

на автореферат диссертации Устьянцевой Елизаветы Ивановны на тему «Создание и функциональный анализ клеточной модели бокового амиотрофического склероза с помощью генетически-кодируемых биосенсоров», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 (клеточная биология, цитология, гистология)

Диссертационная работа Устьянцевой Е.И. является экспериментальным исследованием, в котором решена задача критической важности в современной медицинской науке, а и именно создание и характеристика пациент-специфичной системы для клеточного моделирования тяжелейшего нейродегенеративного заболевания - бокового амиотрофического склероза (БАС).

Еще одним важнейшим аспектом исследования патогенеза БАС, связанного с редокс-стрессом, является прижизненная визуализация изменений, связанных с прогрессированием БАС. Для решения этой задачи автором использован современный подход – генетически кодируемые биосенсоры перекиси водорода, являющиеся высокочувствительными и специфичными системами для оценки статуса редокс-системы, активность которой изменена у больных с БАС, приводя к дегенерации моторных нейронов.

Автором работы для создания модельной системы использован современный подход генерации индуцируемых плюрипотентных стволовых клеток человека (ИПСК), получающий в последние годы широкое распространение для получения клеточных моделей заболеваний человека (*disease in a dish*). Отдельного внимания заслуживает использованием ИПСК как с наследственными мутациями в гене *SOD1*, так и точная валидация выбранного подхода, включавшая внесение точечных мутаций в этот ген с помощью системы редактирования генома CRISPR/Cas9. Наблюдавшиеся изменения в обеих клеточных линиях были схожи, что вносит важный уточняющий вклад в вопрос о роли полиморфизма и мутаций гена *SOD1* как патогенетического фактора развития БАС.

Полученные автором результаты тестов на плюрипотентность убедительно свидетельствуют об успешном получении промежуточной модельной культуры, которая затем была использована для получения целевой культуры моторных нейронов. В ходе характеристики ИПСК получены данные, подтвердившие как их дифференцировку в клетки 3-х зародышевых листков, так и проведены тесты *in vivo*, показавшие тератогенные потенциал, говорящий об истинно плюрипотентном состоянии полученных клеток.

Полученные путем направленной дифференцировки моторные нейроны, как было показано автором, имели все гистологические и морфологические признаки, характерные для данного типа клеток. В частности, подтверждена экспрессия ключевых маркеров зрелых мотонейронов человека (HB9, ChAT и ISL1), что подтвердило эффективность протокола дифференцировки ИПСК. Таким образом, автором была корректно и в полном объеме решена поставленная в работе задача, а использованные им подходы позволили всесторонне охарактеризовать полученную уникальную клеточную модель БАС – тяжелого нейродегенеративного заболевания человека.

Успешность внесения биосенсоров для визуализации активности перекиси водорода в цитоплазме и митохондриях полученных линий ИПСК была также валидирована авторами в серии функциональных и морфометрических тестов, в т.ч. с изменениями

состава среды (добавление или удаление нейротрофических факторов) и при условиях модельной эксайтотоксичности.

Экспериментальные и статистические методы, использованные автором в работе, являются современными и вкупе с корректной интерпретацией позволили сделать логичные выводы, подкрепленные полученными данными. При обсуждении результатов в соответствующем разделе диссертации автором приведены данные других групп и исследователей и обсуждены некоторые важные находки. В частности, тот факт, что внесенные в ген *SOD1* замены по-разному влияют на функционирование моторных нейронов, что соотносится с индивидуальными различиями клинического течения БАС. Последнее наблюдение подкрепляет релевантность полученной модели и обосновывает ее персонализированный характер, а также целесообразность использования в фундаментальных и трансляционных исследованиях БАС, что и было предложено автором в заключительной части работы.

Автореферат оформлен в соответствии с существующими требованиями к изложению основных и наиболее важных находок, хорошо проиллюстрирован и написан доступным литературным языком. Таким образом, диссертационная работа Устьянцевой Е.И. содержит решение актуальной задачи медицинской науки, выполнена в соответствии с существующими в этой области стандартами и требованиями. По результатам диссертации Устьянцевой Е.И. в соавторстве опубликованы 4 статьи в научных журналах, входящих в перечень ВАК РФ (в т.ч. в 2-х журналах, входящих в WoS/Scopus), что полностью соответствует требованиям к кандидатской диссертационной работе. Результаты работы были представлены на 7 международных научных конференциях, автором также опубликована глава в коллективной монографии на актуальную тему («Методы редактирования генов и геномов», 2020 г.).

Диссертация Устьянцевой Е.И. на тему «Создание и функциональный анализ клеточной модели бокового амиотрофического склероза с помощью генетически-кодируемых биосенсоров» по своей актуальности, новизне, объему проведенных исследований является законченной научно-квалификационной работой, полностью соответствует требованиям «Положения о присуждении ученых степеней», предъявляемых к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает присуждения искомой ученой степени по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология.

Макаревич Павел Игоревич, к.м.н.

зав. лаб. генно-клеточной терапии  
Института регенеративной медицины  
Медицинского научно-образовательного центра  
МГУ имени М.В. Ломоносова  
Ломоносовский пр-т, 27, к.10.  
119192, Москва  
email: [pmakarevich@mc.msu.ru](mailto:pmakarevich@mc.msu.ru)

Тел/факс: +7 495 531 2777 (доб. 3156)

Подпись \_\_\_\_\_



*Макаревич П.И. удостоверение  
на соискание звания кандидата наук МГУ  
Игоревич Павел*

«05» октября 2021 г.