

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 03.03.04 – «клеточная биология, гистология, цитология»

Актуальность темы диссертации

В фокусе диссертационного исследования Елизаветы Ивановны Устьянцевой - создание и изучение современных клеточных моделей нейродегенеративных заболеваний. Нейродегенеративная патология в силу своей распространенности, широты клинических проявлений, малой изученности патогенеза, отсутствия сколь-либо значимых достижений в области фармакотерапии остается одной из самых актуальных как с точки зрения фундаментальных исследований, так и в клинике. Боковой амиотрофический склероз (БАС), изучению которого посвящено существенно меньше работ, чем, например, болезни Альцгеймера или болезни Паркинсона, не менее интересен для исследований в области нейробиологии, клеточной биологии, нейрофармакологии. Очевидно, что прогресс в этом направлении в ближайшие годы будет связан с созданием новых клеточных моделей заболевания, которые смогли бы сформировать надежную платформу для изучения клеточно-молекулярных механизмов развития и поиска новых мишеней для профилактики и терапии нейродегенерации, обеспечив таким образом качественно новый уровень трансляционных исследований в неврологии. Междисциплинарный подход, который Е.И. Устьянцева реализовала в своей диссертации, поставил своей целью создание изогенных клеточных линий при таком генетически гетерогенном заболевании, как БАС, и применение генетически-кодируемых биосенсоров для анализа механизмов развития окислительного стресса как доминирующего на сегодняшний день компонента патогенеза БАС.

Следует отметить, что последние 2-3 года ознаменовались появлением новых результатов экспериментальных исследований, выполненных с использованием индуцированных плюрипотентных клеток человека (иПСК) при БАС и имеющих своей целью создание новых клеточных моделей заболевания. В частности, работы N.A. Ababneh et al. (2020), B.W. Kim et al. (2020), Y. Yun et al. (2020), J.D. Pereira et al. (2021), в которых технология геномного редактирования на основе CRISPR-Cas9 была успешно применена для оценки вклада aberrантной экспрессии генов в патогенез заболевания, идентификации патологических фенотипов, связанных с изменениями в синаптической трансмиссии, протеинопатией, развитием окислительного стресса, анализа роли патологии нервно-мышечных контактов в генезе нейродегенерации, и оценки вклада конкретных мутаций в развитие БАС. С учетом того, что известно, по меньшей мере, более 180 мутаций в гене, кодирующем супероксиддисмутазу 1 (SOD1), которые могут приводить к развитию фенотипа, характерного для БАС, а изогенные клеточные линии, которые позволили бы сравнить вклад каждого из генетических вариантов в патогенез и клинические проявления заболевания, отсутствуют, цель, поставленная автором, своевременна и чрезвычайно актуальна.

Таким образом, исследование, выполненное Е.И. Устьянцевой, абсолютно соответствует современным трендам в изучении нейродегенеративных заболеваний на новых клеточных моделях. В связи с этим, заявленная тема работы и ее методологическое обеспечение, а также полученные результаты отличаются актуальностью, современным взглядом на проблему и перспективностью для дальнейшего развития.

Новизна проведенных исследований и полученных результатов

Работа Е.И. Устьянцевой выполнена на высоком современном методическом уровне. Автором применены методы получения иПСК путем репрограммирования из мононуклеаров периферической крови пациентов с

БАС, фенотипирование иПСК с использованием иммуноцитохимии, ПЦР-анализа, секвенирования, методы создания изогенных линий иПСК (CRISPR-Cas9-протокол), имеющих мутации, соответствующие «мягкому» клиническому течению БАС (линия SOD1-D90A) и «агрессивному» клиническому течению БАС (линия SOD1-G127R), методы трансфекции иПСК для доксициклин-управляемой экспрессии биосенсоров перекиси водорода (Cyto-roGFP2-Orp1 и Mito-roGFP2-Orp1), анализ клонов иПСК для идентификации наличия целевых замен и отбор соответствующих клонов, выявление рекомбинантных клонов иПСК, методы направленной дифференцировки иПСК в мотонейроны *in vitro* с фенотипированием полученных клеток (иммуноцитохимия, проточная цитометрия, ПЦР-анализ, определение длины отростков нейронов) и анализом экспрессии генов-маркеров зрелых моторных нейронов HB9, ISL1, CHAT, сенсоров Cyto-roGFP2-Orp1 и Mito-roGFP2-Orp1 в зависимости от условий дифференцировки клеток, методы регистрации окислительного стресса в полученных клетках, экспрессирующих биосенсоры, с визуализацией клеток в режиме реального времени, а также методы статистического анализа полученных данных. Считаю важным отметить, что подробное и хорошо структурированное описание всех примененных протоколов исследования, приведенное в разделе «Материалы и методы», наглядно демонстрирует не только высокий методологический уровень, но и отличное владение автором нюансами каждой примененной технологии.

Применение такого дизайна исследования позволило получить научные результаты, обладающие несомненной новизной. Так, Е.И. Устьянцевой убедительно продемонстрировано, как применением CRISPR-Cas9-протокола позволило получить панель изогенных линий иПСК (репрограммированных из мононуклеаров периферической крови здорового донора) с внесенными заменами нуклеотидов в генез SOD1. Экспериментально доказано, что применение CRISPR-Cas9 наиболее эффективно при доставке компонентов системы в клетки в формате рибонуклеопротеидных комплексов, а не с

помощью плазмиды методом трансфекции. Из мононуклеаров периферической крови пациента с БАС были получены линии iPSC, демонстрирующие генетические особенности донора, ответственные за формирование патологического фенотипа (гомозиготная однонуклеотидная замена в 4 экзоне гена SOD1). Впервые полученные линии iPSC были включены автором в Европейский регистр линий стволовых клеток. С использованием полученных iPSC (пациент-специфичная линия iALS, линии K7-4 здорового донора, линии с внесенными в SOD1 мутациями - SOD1-D90A и SOD1-G127R), а также дифференцированных из iPSC мотонейронов, в геном которых методом трансфекции были интегрированы биосенсоры перекиси водорода, автором были зарегистрированы особенности ответа клеток на индукцию в них окислительного стресса (инкубация с перекисью водорода).

В работе впервые проведено сравнение особенностей реагирования двух биосенсоров на изменение редокс-статуса и показано, что Cyto-roGFP2-Orp1 относительно слабо реагирует на восстановление, чем на окисление, а Mito-roGFP2-Orp1 такой разнонаправленной реакции не демонстрирует. Установлено, что клетки линии SOD1-G127R характеризуются выраженными признаками индуцированного окислительного стресса в митохондриях и цитозоле, более того, исходный уровень окисления был крайне высок, что позволяет предполагать большую степень окислительного повреждения клеток при данной мутации. Действительно, далее автором было обнаружено, что, в соответствии с патологическим фенотипом, средняя длина аксонов нейронов линии iALS, линии SOD1-D90A и, особенно, линии SOD1-G127R была существенно ниже, чем в контроле, что соответствовало «агрессивности» индуцированных мутаций в соответствующих модельных линиях клеток. Эти же клетки (линия SOD1-G127R) демонстрировали минимальную устойчивость в модели хронической глутаматной эксайтотоксичности. Применительно к культуре мотонейронов интересной находкой следует считать и то, что клетки не всегда сохраняли экспрессию биосенсора к завершению протокола

дифференцировки, и это не зависело от клона, из которого нейроны были получены, что, несомненно, должно учитываться при выполнении работ, связанных с регистрацией сигнала от генетически-кодируемого биосенсора в клетках разной степени дифференцировки *in vitro*. Заслуживает особого внимания гипотеза автора, связывающая особенности локализации пула молекул перекиси водорода в зависимости от активности и ресурсов антиоксидантных систем клетки: недостаточность антиоксидантной системы в цитоплазме клетки способствует трансферу молекул перекиси водорода в митохондрии и индукции клеточной гибели.

В целом, новизна полученных Е.И. Устьянцевой результатов может быть лаконично сформулирована следующим образом: 1) создана новая экспериментальная платформа на основе изогенных линий иПСК с однонуклеотидными заменами в гене SOD1, демонстрирующих фенотипические проявления патологии, характерной для БАС; 2) разработаны новые модельные клеточные системы для оценки окислительного повреждения клеток, обусловленного перекисью водорода, в цитозоле и митохондриях, на основе генетически-кодируемых биосенсоров, чья экспрессия управляется доксициклином, и доказана их информативность для регистрации патологических изменений в клетках при БАС; 3) идентифицированы особенности экспрессии генетически кодируемых биосенсоров при применении различных протоколов встройки генетических конструкций, а также в динамике клеточной дифференцировки при получении мотонейронов из иПСК; 4) доказано, что сенсоры Cyto-roGFP2-Orp1 и Mito-roGFP2-Orp1 могут использоваться как для мониторинга стационарного уровня перекиси водорода, так и для исследования ее колебаний в клетках, зарегистрировано, что сенсоры Cyto-roGFP2-Orp1 и Mito-roGFP2-Orp1 высокочувствительны к микроокружению в клеточной системе и действию внешних факторов; 5) доказано влияние характера («агрессивности») мутации на фенотипические проявления клеточной патологии при БАС (жизнеспособность клеток, развитие окислительного стресса, рост аксонов,

устойчивость к токсическому действию глутамата в модели эксайтотоксичности *in vitro*); 6) продемонстрировано, что митохондриальная дисфункция лежит в основе зарегистрированных проявлений окислительного стресса и нарушения формирования аксонов в мотонейронах, дифференцированных из иПСК с «агрессивным» фенотипом (линия SOD1-G127R).

Считаю, что диссертационное исследование Е.И. Устьянцевой обладает несомненной научной новизной как по методологии работы, так и по полученным результатам и их интерпретации.

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

Обоснованность основных положений, выводов, сформулированных в диссертации Е.И. Устьянцевой, обусловлена несколькими важными факторами: 1) интересный, нестандартный и комплексный дизайн исследования с детализированными протоколами, с применением альтернативных методов, а также исследований, дополняющих друг друга; 2) приверженность автора принципам контроля качества исследований на каждом из этапов, что подтверждается применением контрольных групп, групп сравнения, тестированием разных условий культивирования, трансфекции и пр.; 3) применение современных исследовательских протоколов, эффективность и информативность которых доказана на различных модельных системах, в сочетании с оригинальными – авторскими – модификациями; 4) рациональный и критический взгляд автора на собственные результаты, что особенно хорошо демонстрируется в главе «Обсуждение», в том числе при сопоставлении собственных результатов с литературными данными; 5) обоснование каждого из избранных экспериментальных протоколов с идентификацией имеющихся проблем методического характера, решение части которых осуществлено в рамках

настоящего исследования; б) обсуждение результатов работы научным сообществом по представленным в печати и в докладах конференций материалам.

Положения, выносимые на защиту, и выводы опираются на конкретные результаты, свидетельствуют о достижении цели и решении всех заявленных в работе задач. В целом, нет сомнений в том, что в диссертации Е.И. Устьянцевой представлены достоверные и обоснованные результаты и выводы.

Значимость результатов, полученных в диссертации, для науки и практики

Значимость полученных результатов диссертации Е.И. Устьянцевой для фундаментальной науки (клеточная биология, цитология, молекулярная биология, нейробиология) определяется тем, что автором: 1) с использованием иПСК и протокола CRISPR-Cas9 получены новые изогенные линии, воспроизводящие патологические фенотипы при БАС; 2) идентифицированы новые особенности развития нейродегенерации при БАС, заключающиеся в митохондриальной дисфункции, способствующей прогрессированию окислительного повреждения и нарушению процессов нейритогенеза; 3) установлены условия эффективной экспрессии, доказана информативность и оценены лимитирующие факторы для применения двух генетически-кодированных биосенсоров перекиси водорода в клетках; 4) получены новые доказательства вклада мутаций в гене SOD1 в формирование нейродегенерации при БАС.

Значимость результатов диссертации для практической деятельности (неврология, регенеративная медицина, фармакология) определяется тем, что они: 1) формируют научную основу для разработки новых методов терапии БАС; 2) создают платформу для трансляционных исследований, базирующихся на новых клеточных моделях заболевания.

В целом, с учетом указанных аспектов, считаю, что диссертация Е.И. Устьянцевой имеет высокую теоретическую и практическую значимость.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

Результаты диссертационного исследования Е.И. Устьянцевой могут быть рекомендованы к использованию в следующих областях: 1) клеточная биология, цитология, молекулярная генетика – при планировании и выполнении экспериментов с использованием иПСК, протоколов геномного редактирования, трансгеноза, направленной дифференцировки клеток; 2) биофотоника – при разработке новых биосенсоров на основе флуоресцентных белков; 3) нейробиология и (пато)физиология – при изучении клеточно-молекулярных механизмов развития головного мозга, возникновения и прогрессирования нейродегенерации, при оценке роли митохондриальной дисфункции и окислительного стресса в повреждении клеток; 4) высшее профессиональное образование в области биологии и медицины. Все указанные направления могут быть реализованы в университетах, клинических и академических центрах Российской Федерации.

Оценивая содержание диссертации в целом, считаю важным отметить, что работа читается с большим интересом, так как демонстрирует хорошие аналитические способности автора, его склонность обсуждать разные, подчас противоречивые, точки зрения и результаты. Несомненным достоинством диссертации является присутствие в ней большого объема иллюстративного материала, который не только характеризует полученные автором данные, но и систематизирует современные представления по проблематике работы. В целом, очевидно, что автор полностью сформировался как самостоятельный ученый-экспериментатор и аналитик.

Диссертация изложена на 150 страницах машинописного текста, имеет классическую структуру, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, главы с 4-мя разделами с описанием результатов, обсуждения, заключения, выводов, 4-х приложений, списка литературы, списка использованных сокращений.

Во введении представлены основные положения, касающиеся актуальности, цели, задач выполнения работы, ее научной новизны, теоретической и практической значимости, охарактеризованы апробация полученных результатов и личный вклад соискателя в работу. Обзор литературы достаточно подробный, детализированный, объединяет данные из разных областей науки (клеточно-молекулярные механизмы развития БАС, методы получения и использования иПСК и их потомков, технологии геномного редактирования, принципы применения генетически-кодируемых сенсоров, утилизирующих регистрацию сигнала флуоресценции). Каждый из разделов обзора литературы отличается внутренней логикой, хорошей систематизацией данных. Глава «Материалы и методы» подробно описывает каждый из примененных методов исследования, содержит обоснование выбора протокола, считаю, что эта глава, фактически, представляет собой качественное руководство для других исследователей, которые планируют заниматься аналогичными по методологии работами. Главы «Результаты» и «Обсуждение» логически связаны друг с другом, отражают все полученные автором результаты и их интерпретацию.

Результаты исследования полно представлены в научных профильных изданиях, а также на конференциях российского и международного уровней.

Автореферат диссертации оформлен в соответствии с общепринятыми требованиями, соответствует ее содержанию и дает полное представление об основных положениях работы. Замечаний принципиального характера по автореферату нет.

При чтении работы возникли следующие замечания: 1) в тексте встречаются единичные опечатки и неудачные стилистические обороты; 2) в главе «Обсуждение» логичным было бы присутствие 1-2 авторских схем, резюмирующих полученные результаты; 3) в перечне выводов отсутствуют те, что соответствовали бы задачам 1 и 2, хотя они явно следуют из совокупности полученных результатов; 4) в заключительной части диссертации отсутствует раздел «Практические рекомендации», что удивительно с учетом того, что они определенно могут быть сделаны, исходя из полученных результатов. Однако все указанные замечания не носят принципиального характера и не влияют на общее сугубо положительное впечатление от работы.

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

- 1) Что, по мнению автора, определяет возможности применения разработанных клеточных моделей для скрининга лекарств-кандидатов при БАС?
- 2) Каковы, по мнению автора, возможные подходы к управлению уровнем экспрессии генетически-кодируемых флуоресцентных биосенсоров в динамике дифференцировки клеток *in vitro*?
- 3) Насколько значима роль дисфункции митохондрий в прогрессировании окислительного стресса в нейронах при БАС и есть ли доказательства трансфера активных форм кислорода и/или перекиси водорода из цитозоля в митохондрии?
- 4) Известно, что перекись водорода, генерируемая в клетках при БАС в супрафизиологических концентрациях, способствует нарушению конформации (мисфолдингу) SOD1 и TDP43. Насколько вероятно, по мнению автора, зарегистрировать такие события в мотонейронах с помощью флуоресцентных биосенсоров, регистрирующих присутствие склонных к агрегации аномальных белков в клетках?

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 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 многоклеточных, малоклеточных и одноклеточных организмов в норме и патологии»), п. 7 («разработка экспериментальных моделей, методов цитологической диагностики, морфометрии, маркерной гисто- и цитохимии»).

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 законченной, самостоятельной научно-квалификационной работой, содержащей решение важной научной задачи клеточной биологии, цитологии, гистологии – создание и изучение новых клеточных моделей заболеваний человека, вносящей таким образом значительный вклад в развитие представлений о клеточно-молекулярных механизмах нейродегенерации и способах регистрации патологических изменений в клетках. По новизне, научной и практической ценности полученных результатов, перспективам их практического применения диссертация полностью соответствует требованиям «Положения о порядке присуждения 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 с

изменениями от 26 мая 2020 г.), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор – Устьянцева Елизавета Ивановна - заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – «клеточная биология, цитология, гистология».

Официальный оппонент:

Главный научный сотрудник и заведующий
Лабораторией экспериментальной нейрцитологии
Отдела исследований мозга
Федерального государственного бюджетного
научного учреждения «Научный центр неврологии»,
доктор медицинских наук
(14.03.03 – патологическая физиология),
профессор

Алла Борисовна Салмина

Россия, 125367, г. Москва,
Волоколамское шоссе, д.80,
Тел. +7(495)9170999; E-mail: allasalmina@mail.ru

Подпись доктора медицинских наук, профессора Салминой А.Б. удостоверяю:

Учёный секретарь Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научный центр неврологии», старший научный сотрудник, кандидат медицинских наук



Анна Николаевна Евдокименко

« 09 » сентября 2021 г.

64 2171/84
15.09.2021