

ОТЗЫВ

об автореферате диссертации Е.И. Устьянцевой «Создание и функциональный анализ клеточной модели бокового амиотрофического склероза с помощью генетически-кодируемых биосенсоров», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности «Клеточная биология, цитология и гистология».

Современные представления об индуцированных плюрипотентных стволовых клетках (иПСК) открыли уникальные возможности изучения патогенеза различных заболеваний человека. Согласно одному из практических направлений на базе иПСК можно создавать модельные патологические системы через целевое репрограммирование иПСК по специфическим генам, сопряженным с тем или иным заболеванием. В диссертационной работе Е.И. Устьянцевой для изучения клеточных механизмов возникновения тяжелого нейродегенеративного заболевания бокового амиотрофического склероза (БАС) использована изящная экспериментальная схема с применением этих искусственно полученных клеток. Затем иПСК дифференцируют *in vitro* в специализированные соматические клетки, в случае Е.И. Устьянцевой - в моторные нейроны. В результате соискателю удалось создать патологически модифицированные нейронные клетки. Выполнив этот важный этап исследований, Е.И. Устьянцева получила в свое распоряжение специализированный генетически чистый клеточный материал - патологически измененные изогенные моторные нейроны - узловые биологические структуры, повреждаемые при БАС. В трех типов клеток с использованием различных биохимических и биофизических методов было изучено функционирование двух узловых внутриклеточных процессов. Основная экспериментальная работа концентрировалась на гене *SOD1*, содержащемся в клеточном геноме здорового донора, исходных иПСК и иПСК с однонуклеотидными заменами, типичными для БАС. На следующем этапе в локус *AAVS1* геномов трех типов клеток были встроены конструкции *CytoroGFP2-Orp1* и *Mito-roGFP2-Orp1*, обеспечивающие экспрессию белков- биосенсоров, содержащих зеленый флуоресцирующий белок и реагирующих на изменение концентрации перекиси водорода в цитоплазме клетки и митохондриях, соответственно. Последующие исследования были посвящены сравнительному анализу ответов всех клеток на стрессорное воздействие перекиси водорода и глутамата, который вызывает в клетках эксайтотоксичность.

В целом, в работе можно выделить две группы экспериментов, генно-инженерный и морфо-функциональный. Высокой положительной оценки заслуживает комплекс экспериментов в рамках первой группы, выполненных на самом современном научно-методическом уровне, соответствующем мировому. В этих экспериментах, требующих тщательного исполнения и мастерства, получены объекты для морфологического и функционального

анализа моторных нейронов, «поломка» которых, имеющая генетическую природу, лежит в основе БАС. Результаты этих экспериментов четко показывают, к чему приводят мутации в гене *SOD1* и как они сказываются на способности клетки осуществлять протекание ключевых клеточных процессов жизнедеятельности. Введенные в геномы вышеупомянутые генетические конструкции выступали в роли своеобразных сенсоров, сигнализирующих о и функциональной активности клеток по двум параметрам, ответу на стрессорное действие перекиси водорода и глутамата. В опытах с биосенсорами моторные нейроны обрабатывались или окислителем или восстановителем или в среду добавлялась H_2O_2 . На действие восстановителя оба сенсора не реагировали, Окислитель, наоборот, вызывал зависимое от времени увеличение сигналов. H_2O_2 в концентрации 10 мкм оказалась эффективной в случае сенсора Cyto-roGFP2-Orp1 и не вызывала заметного эффекта у сенсора Mito-roGFP2-Orp1, сигнализируя о событиях, имеющих место в этих условиях в цитоплазме клеток, а не митохондриях. Эти эксперименты выполнены с большим тщанием и проведением различных контрольных измерений.

В заключение, давая на основании автореферата высокую положительную оценку диссертации, следует отметить, что работа Е.И. Устьянцевой открывает перспективу дальнейших исследований в области патогенеза и поиска подходов для эффективного лечения не только БАС, но и других имеющих генетическую природу заболеваний человека,.

В целом, диссертация Е.И. Устьянцевой по объему проведенных исследований, своей актуальности и новизне является законченной научно-квалификационной работой и полностью соответствует требованиям «Положения о присуждении ученых степеней», предъявляемых к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология и гистология, а ее автор заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата наук.

Волотовский И.Д.,
доктор биол. наук, академик НАН Беларуси,
главный научный сотрудник
Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси
220076, г. Минск, Академическая ул.27, Беларусь
Эл. почта volotovski@yahoo.com
тел.служ. +375173541568

