

Отзыв

на автореферат диссертации Валетдиновой Камилы Робертовны **«Получение модельной системы спинальной мышечной атрофии на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека»**, представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика

Данная работа посвящена разработке клеточной модели спинальной мышечной атрофии на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека.

Спинальная мышечная атрофия (СМА) объединяет группу наследственных заболеваний, отличительной особенностью которых является прогрессирующая дегенерация периферических моторных нейронов, что приводит к развитию симметричного вялого паралича поперечно-полосатой мускулатуры и является одним из наиболее распространенных наследственных заболеваний.

Как и для большинства нейродегенеративных заболеваний, для СМА до сих пор не существует эффективного лечения, и больные вынуждены быть ограничены только паллиативными методами терапии. Такие больные нуждаются в квалифицированном уходе, специальных средствах гигиены и питания, а также в респираторной поддержке. Все эти факторы в определенной степени могут продлить жизнь больного на некоторое количество месяцев или лет, но не улучшают ее качества.

Важно понимать, что создание нового терапевтического подхода к лечению таких пациентов, требует экспериментальной разработки релевантных клеточных моделей данного заболевания.

В работе Валетдиновой Камилы Робертовны разработана новая модельная система, состоящая из пациент - специфичных клеток больных СМА I и II типа и здорового человека, поэтому актуальность и научная новизна исследования сомнений не вызывает.

Высокий уровень методической подготовки автора позволил продемонстрировать, что индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) человека, полученные из фибробластов пациентов со спинальной мышечной атрофией I и II типа с помощью эписомных векторов, имеют генотип больных и свойства самообновления и плюрипотентности. Автору данной работы удалось достичь большой эффективности репрограммирования клеток, что вероятно было связано с большим количеством эписомной ДНК, приходящейся на одну клетку-мишень. Эффективность репрограммирования, оцененная как отношение количества колоний, положительно окрашивающихся на щелочную фосфатазу к исходному количеству клеток, составила 0,1% (~ 100 колоний на 10×10^5 клеток). Важно отметить, что полученные значения эффективности репрограммирования на порядок выше, чем аналогичные значения не

только полученные автором в более ранних экспериментах, но и коллективами зарубежных исследователей. Экспрессия ключевых генов плюрипотентных клеток человека в полученных линиях ИПСК была продемонстрирована с помощью двух различных методов, что говорит о скрупулезности подхода, который автор применил для решения поставленных экспериментальных задач. Плюрипотентный статус полученных линий ИПСК был подтвержден с помощью спонтанной дифференцировки *in vitro*. Кроме того, полученные линии были оценены по результатам теста на спонтанную дифференцировку. В системе *in vivo* было показано, что линии ИПСК iSMA37, iSMA40, iSMA6L, m3SMA6 образуют производные трех зародышевых листков, что позволяет сделать вывод о плюрипотентности данных клеточных линий. Кариотипирование полученных линий ИПСК, позволили автору выявить оптимальные сроки и условия культивирования исследуемых клеток. Было установлено, что для получения адекватных результатов при изучении клеточной модели СМА, принципиальным является использование ИПСК на ранних пассажах культивирования.

Особый интерес на наш взгляд представляет раздел работы посвященной направленной дифференцировке ИПСК в моторные нейроны. Автор продемонстрировал, что все стадии нейральной дифференцировки от предшественников моторных нейронов до их зрелых форм были пройдены клетками различных линий с примерно одинаковой эффективностью. На стадии нейроэпителиальных предшественников показана экспрессия основного маркера данного типа клеток – транскрипционного фактора SOX1, а также транскрипционного фактора PAX6. Среднее количество SOX1+ клеток на 9 день дифференцировки составило 90%. PAX6+ клеток – 71%. На заключительной стадии дифференцировки была показана экспрессия СНАТ (ацетилхолинтрансфераза) – фермента, обеспечивающего биосинтез нейромедиатора ацетилхолина, необходимого для передачи нервного импульса моторными нейронами, осуществляющими нервно-мышечную передачу. Именно поэтому данный белок, будучи одним из основных структурных элементов синаптической мембраны и маркером зрелых функциональных синаптических контактов может маркировать зрелые моторные нейроны, способные осуществлять свою основную функцию. Отростки зрелых моторных нейронов формировали между собой многочисленные синапсы. В участках формирования синапсов была показана экспрессия белка SYNI.

Таким образом, в данной работе в результате направленной дифференцировки ИПСК от больного спинальной мышечной атрофией I, II типа и здорового человека были получены моторные нейроны, экспрессирующие основные маркеры данного типа нервных

клеток и которые могут быть применены в качестве компонентов модельной системы для изучения патогенеза данного заболевания.

Есть все основания полагать, что разработанная автором клеточная модель спинальной мышечной атрофии послужит основой для исследования особенностей данного заболевания на молекулярном и клеточном уровнях, а также для разработки высокоэффективных и безопасных методов исправления мутаций, вызывающих СМА, и скрининга потенциальных лекарственных соединений.

Все положения, выносимые на защиту, нашли отражение в выводах работы, которые полностью соответствуют поставленным целям и задачам исследования.

Резюмируя вышеизложенное, следует отметить, что диссертационная работа Валетдиновой Камилы Робертовны «Получение модельной системы спинальной мышечной атрофии на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека» является законченным научным исследованием, выполненном на современном научном и методическом уровне, и соответствует требованиям «Положения о присуждении ученых степеней», предъявляемым к такого рода исследованиям, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика.

Руководитель отдела фундаментальной и прикладной нейробиологии
ФМИЦПН Минздрава России
Академик РАН Чехонин В.П.

Старший научный сотрудник лаборатории иммунохимии
отдела фундаментальной и прикладной нейробиологии
ФМИЦПН Минздрава России
к.б.н. Степанова О.В.

Ученый секретарь
к.м.ч.



С.В. Шпорт