

## ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук, профессора Гуляевой Людмилы Федоровны на диссертационную работу Валетдиновой Камилы Робертовны «Получение модельной системы спинальной мышечной атрофии на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика

**Актуальность темы.** Одним из стремительно развивающихся направлений современной генетики является перепрограммирование генома для проведения исследований, как в области биологии, так и медицины. Перспективным вектором таких исследований является получение клеточных моделей заболеваний человека из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) пациента. В диссертационной работе Валетдиновой Камилы Робертовны с помощью такого подхода создается клеточная модель спинальной мышечной атрофии (СМА) человека. СМА представлена группой наследственных заболеваний, сопровождающихся дегенерацией периферических нейронов, что вызывает раннюю детскую смертность. Установленным фактором, приводящим к развитию этой патологии, является мутации в гене *SMN1* (survival of motor neuron). На сегодняшний день не существует адекватной модели для изучения патогенеза СМА и подходов к ее лечению. В диссертационной работе Валетдиновой К.Р. предлагается воспроизвести фенотип данного заболевания с помощью ИПСК, полученных от пациентов. Поэтому актуальность настоящего диссертационного исследования не вызывает сомнения.

**Научная новизна** диссертационной работы не вызывает сомнения. В этой работе многие результаты получены впервые. Итогом проведенных экспериментов было получение клеточных линий, моделирующих СМА, из ИПСК пациентов со СМА I и II типов, а также клеточной линии здорового человека. Все этапы перепрограммирования генома больных СМА были проведены впервые. На первоначальном этапе репрограммирование фибробластов больных и здоровых

людей к плюрипотентному состоянию осуществлено с помощью эписомных векторов – кольцевых молекул ДНК, которые не интегрируются в геном, что обеспечило временную экспрессию факторов репрограммирования. Впервые проведена направленная дифференцировка специфичных клеточных линий пациентов и здорового человека в моторные нейроны, которые экспрессировали маркеры зрелых двигательных нейронов.

**Теоретическая и практическая значимость результатов диссертационного исследования.** Результаты диссертационной работы Валетдиновой К.Р., показавшие возможность получения клеточных моделей нейродегенеративных болезней из ИПСК пациентов со СМА I и II типов, представляют несомненный интерес для фундаментальной науки, занимающейся проблемами репрограммирования генома и клеточной дифференцировки. Созданная клеточная модель СМА может быть использована для изучения молекулярно-генетических и патофизиологических механизмов развития спинальной мышечной атрофии. С практической точки зрения, такие клеточные линии могут быть использованы для проведения фармакологических и токсикологических исследований.

**Степень достоверности и обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.** Основные результаты по созданию новых клеточных линий, моделирующих СМА, получены лично автором. Достоверность полученных результатов не вызывает сомнения. Все исследования проведены с привлечением современных экспериментальных методик высокого технологического уровня. Выводы и рекомендации диссертационной работы корректны и в полной мере отражают полученные результаты.

**Объем и структура диссертации.** Диссертационная работа Валетдиновой К.Р. изложена на 135 страницах, она содержит 21 рисунок и 7 таблиц. Диссертационная работа включает введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение результатов, заключение, выводы, список цитируемой литературы (239 источника), приложение.

Во введении автор обосновывает актуальность выбранного исследования, на основании чего четко формулирует цель и задачи исследования, научную новизну,



теоретическую и практическую значимость полученных результатов.

Обзор литературы состоит из 2-х больших глав. Первая глава посвящена характеристике и классификации спинальной мышечной атрофии. Здесь приведены основы этиопатогенеза данной болезни с акцентом на локус СМА 5q13. В этой главе также приведена характеристика белка SMN, важного регулятора сплайсинга мРНК, а также имеющиеся на сегодня подходы к диагностике СМА на генетическом уровне. Вторая глава обзора посвящена ИПСК человека и возможности их использования для создания клеточных моделей СМА человека. Здесь приводятся способы репрограммирования соматических клеток к плюрипотентному состоянию, методы оценки плюрипотентного статуса стволовых клеток человека, а также подходы к направленной дифференцировке ИПСК в моторные нейроны. Автором проанализированы проблемы, касающиеся перепрограммирования генома, в том числе для создания клеточных моделей СМА человека.

Материалы и методы исследования адекватны поставленной цели и решаемым задачам. В работе использован необходимый набор современных методов генетики и клеточной биологии.

В главе «Результаты и обсуждение», где представлены результаты собственных исследований, последовательно приводятся этапы проведения экспериментов по созданию клеточных линий от пациентов со СМА, проводится анализ полученных данных для разных клеточных линий. Здесь представлен достаточно глубокий анализ полученных результатов в контексте сравнения с современными данными научной литературы. На основании полученных результатов исследования формулируются выводы и заключение. В целом, считаю, что диссертационная работа Валетдиновой К.Р. выполнена на высоком научно-методическом уровне.

Результаты проведенного исследования убедительно показали, что автором получена новая модельная система, состоящая из пациент-специфичных клеток больных СМА I и II типа и здорового человека. Полученные клеточные линии могут быть использованы в дальнейшем для исследования механизмов развития болезни, для разработки высокоэффективных и безопасных методов исправления мутаций, вызывающих СМА, а также скрининга больших панелей потенциальных

лекарственных соединений. Такие результаты, без сомнения, представляют интерес для научно-исследовательских учреждений, занимающихся проблемами генетики заболеваний нервной системы, в частности, СМА. Использование результатов исследования, полученных Валетдиновой К.Р., представляется также целесообразным для генетиков, биохимиков, молекулярных биологов и патофизиологов.

Материалы диссертационного исследования доложены и обсуждены на 3-х российских конференциях с международным участием. По результатам диссертации опубликовано 2 статьи в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК.

Выводы диссертации соответствуют цели, задачам и основным положениям. Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

Вместе с тем, при прочтении работы у меня возникли некоторые вопросы:

1. В главе «Материалы и методы» отсутствует информация о пациентах, у которых были взяты фибробласты. Не понятно, какие генетические нарушения у них были.

2. Есть вопросы к экспериментам по определению делеций 7-8 экзонов гена *SMN1/2* и копииности гена (рис. 17, с. 90). На электрофореграммах нет маркеров м.м., результаты сложны для восприятия, так как отсутствует схема эксперимента. На с. 73-74 есть лишь скудная информация о ферментах рестрикции ДНК.

3. В экспериментах по определению копииности гена *SMN* в клеточных линиях не приведена калибровочная кривая. В «Материалах и методах» на стр. 72 есть лишь описание метода с применением одного референсного локуса.

4. В диссертации отсутствует информация о статистических методах, используемых в работе. Или они не использовались?

Приведенные выше вопросы носят дискуссионный характер и не снижают моей высокой оценки выполненной работы.

**Заключение.** Диссертационная работа на тему "Получение модельной системы спинальной мышечной атрофии на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека" соответствует критериям пп. 9-14 "Положения о порядке присуждения ученых степеней", утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 года № 842, и представляет собой завершённую научно-квалификационную работу, а ее автор Валетдинова Камила Робертовна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 - генетика.

Гуляева Людмила

Федоровна

**Официальный оппонент**

доктор биологических наук,  
профессор, руководитель лаборатории  
молекулярных механизмов  
канцерогенеза Федерального  
государственного бюджетного  
научного учреждения «Научно-  
исследовательский институт  
молекулярной биологии и биофизики»  
630117, Россия, г. Новосибирск,  
ул. Тимакова, 2/12,  
Тел. 8(383) 335-98-47  
imbb@niimbb.ru  
http://niimbb.ru

18 января 2017 г.

Личную подпись *Гуляева Л.Ф.* заверяю  
Начальник отдела кадров НИИМББ  
"18" января 2017 г.

