

Федеральное агентство научных
организаций
(ФАНО России)
**Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки
Институт биологии развития
им. Н.К.Кольцова РАН
(ИБР РАН)**
ул. Вавилова, д. 26, Москва, 119334
Тел. (499)135-33-22, Факс (499) 135-80-12
E-mail: idb@idbras.ru
http://idbras.comcor.ru
ОКПО 02699062, ОГРН 1027700450800,
ИНН 7736044850 / КПП 773601001

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального государственного
Бюджетного учреждения науки
Институт биологии развития
им. Н.К. Кольцова
Российской академии наук,
доктор биологических наук,
член-корреспондент РАН



А.В. Васильев

23 декабря 2016 г.

23.12.2016 № 12506-02/636
На № _____ от _____

ОТЗЫВ

Ведущей организации – Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова Российской академии наук – 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 диссертации.

Моделирование наследственных заболеваний *in vitro* – актуальное направление современной клеточной биологии, биологии развития и генетики. Такой подход к изучению наследственных заболеваний дает множество преимуществ, таких как возможность исследования начальных стадий заболевания, возможность работы на охарактеризованном человеческом материале (а не на приближенных животных моделях), а также возможность в необходимый момент масштабировать модель до уровня тест-систем скрининга лекарственных препаратов.

Цель работы Валетдиновой Камилы Робертовны заключалась в исследовании возможности создания модели *in vitro* спинальной мышечной атрофии (наследственной формы, связанной с мутацией в гене SMN1), при помощи индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК).

Для достижения этой цели были поставлены задачи по получению нескольких линий ИПСК от различных доноров – носителей данного заболевания, их исследованию, а также разработке протокола дифференцировки ИПСК в моторные нейроны с последующим анализом полученных культур клеток. Решались и другие актуальные и значимые задачи.

Структура и содержание работы.

Диссертация состоит из введения, трех глав, выводов и списка литературы. Работа изложена на 135 страницах, содержит 21 рисунок и 7 таблиц, и построена по традиционному плану.

Во введении автор достаточно ясно описывает актуальность, а также цели и поставленные задачи.

В главе «Обзор литературы», занимающей 40 страниц, обсуждены спинальная мышечная атрофия, ее наследуемые формы, и существующие на сегодняшний день модели этого заболевания. В целом обзор литературы содержит достаточно информации необходимой для дальнейшего осмысления и оценки полученных в диссертации результатов.

Глава «Материалы и методы» позволяет оценить Валетдинову Камилу Робертовну как специалиста высокого класса, владеющего широким спектром современных методов исследования в области экспериментальной биологии. К сожалению, в данном разделе не описаны методы статистической обработки данных, получаемых из экспериментов с количественными результатами. Что отражают «усы» погрешностей на рисунках 17, 18, 19? Использовались ли мультиплексные независимые эксперименты для усреднения данных? Использовались ли какие-либо критерии достоверности различия данных и как они рассчитывались?

Глава «Результаты». В ходе работы было получено несколько линий ИПСК от двух доноров – носителей наследственной формы спинальной мышечной дистрофии (I и II типа). Примечательно, что все линии ИПСК были получены при помощи трансфекции эписомальных векторов, с транзientной экспрессией репрограммирующих факторов. Данный подход обеспечивает относительно высокую эффективность репрограммирования (примерно 0,1%), и самое главное – позволяет получать линии ИПСК без внедрения трансгенов в геном клеток. При помощи различных методов, данные линии ИПСК были проанализированы на наличие маркеров плюрипотентных стволовых клеток, а также на способность их спонтанной дифференцировки в клетки всех трех зародышевых листков при образовании эмбрионидных телец. Также был произведен тест на образование тератом в организме иммунодефицитных мышей линии SCID. Интересным результатом работы

К.Р. Валетдиновой является результаты анализа кариотипа исследуемых линий клеток на различных пассажах, который показал значительное накопление хромосомных aberrаций в ИПСК на поздних пассажах культивирования (более 20-и). Данное наблюдение является сильным аргументом сторонников усиленных мер биобезопасности при использовании стволовых клеток в клинической практике. Также был проведен генетический анализ полученных линий ИПСК, который подтвердил наличие характерных для наследственной спинальной мышечной атрофии мутаций, а именно отсутствие 7-го и 8-го экзона в гене SMN1. Был проведен анализ остаточного содержания эписомальных векторов в полученных клетках ИПСК, который показал сильное распределение по результатам – часть клеток элиминировали введенные конструкции, а часть все еще содержали эписомы после 120 дней культивирования. В конечной части диссертационной работы были освоены и модернизированы протоколы направленной дифференцировки ИПСК в моторные нейроны. Статус полученных клеток был подтвержден при помощи иммуоцитохимического окрашивания на соответствующие маркеры. В качестве замечания хочется отметить отсутствие в диссертации и автореферате представленных данных по результатам измерения жизнеспособности полученных моторных нейронов. Так, диссертант в разделе 3.8. результатов пишет: *«Также на стадии зрелых нейронов была отмечена сниженная жизнеспособность моторных нейронов, полученных из ИПСК пациента со СМА I типа по сравнению с контрольными линиями. Однако при добавлении в среду нейротрофических факторов выживаемость моторных нейронов повышалась»*. Из дальнейшего текста диссертации совершенно непонятно, каким образом отмечалась жизнеспособность и какие нейротрофические факторы использовались.

Список использованной литературы состоит из 239 цитируемых источников, что характеризует высокую профессиональную квалификацию автора.

Материалы собственных исследований представлены содержательными микрофотографиями, таблицами и гистограммами. Прделан огромный объем методически сложной работы, освоено и развито множество совершенно различных методов экспериментальной клеточной и молекулярной биологии. Выводы, представленные диссертантом, отражают полученные данные и соответствуют поставленным целям и задачам.

В целом, принципиальных замечаний к работе нет. Работа заслуживает высокой оценки. Автореферат отражает основные положения диссертации.

Значимость результатов для науки и практики.

Таким образом, работа К.Р. Валетдиновой представляет несомненный теоретический и практический интерес, поскольку в ходе ее было создано несколько уникальных линий индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека с наследственной формой спинальной мышечной атрофии. Данные линии клеток могут быть использованы для депонирования в тематические клеточные мастер-банки, поскольку полностью охарактеризованы. Несомненно, полученные К.Р. Валетдиновой результаты станут фундаментом для новых исследований, изучающих различные формы нейродегенеративных заболеваний, которые могут привести к расшифровке механизмов патогенеза и определению стратегии лечения подобных заболеваний. Полученные К.Р. Валетдиновой клеточные линии, методы и подходы могут быть использованы в дальнейшем в таких учреждениях науки как Институт биологии развития им. Н.К.Кольцова РАН, Институт общей генетики им. Н.И.Вавилова, Институт цитологии РАН, в которых в том или ином виде идут исследования плюрипотентных стволовых клеток человека и моделей наследственных заболеваний человека. Также обсуждаемые результаты методы и подходы могут быть использованы в таких учреждениях высшего образования, как Московский государственный университет им. М.В.Ломоносов, Новосибирский государственный университет, Московский физико-технический институт (государственный университет), Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И.Пирогова, где на профильных факультетах осуществляется обучение специалистов в области клеточной биологии, генетики, регенеративной биомедицины.

Заключение.

Все вышеизложенное свидетельствует о том, что представленная к защите диссертационная работа Валетдиновой Камилы Робертовны «ПОЛУЧЕНИЕ МОДЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ СПИНАЛЬНОЙ МЫШЕЧНОЙ АТРОФИИ НА ОСНОВЕ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА» является законченным научным исследованием в рамках поставленных задач, в котором получены новые данные представляющие интерес для науки. Диссертация написана автором самостоятельно, содержит новые данные и положения, выдвигаемые для публичной защиты. Основные данные диссертации опубликованы в рецензируемых научных изданиях, включенных в список ВАК. Количество публикаций соответствует требованиям ВАК. Таким образом, по объему, оформлению и качеству полученных данных представленная диссертационная работа соответствует основным квалификационным

критериям п.9 «Положения о присуждении ученых степеней» от 24 сентября 2013 г. №842, утвержденного постановлением Российской Федерации, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор, Валетдинова Камила Робертовна, заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика.

Отзыв на диссертационную работу К.Р. Валетдиновой подготовлен научным сотрудником ИБР РАН Дашинимаевым Эрдэмом Баировичем, заслушан, обсужден и утвержден на заседании объединенного семинара профильных лабораторий ФГБУН Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН по специальности 03.02.07 – генетика 16 декабря 2016 г., протокол № 4.

Научный сотрудник Лаборатории клеточной биологии
ФГБУН Институт биологии развития
им. Н.К.Кольцова РАН,
кандидат биологических наук

Дашинимаев Эрдэм Баирович

119334, г. Москва, ул. Вавилова, д. 26,
рабочий телефон (499)135-40-81
e-mail: dashinimaev@gmail.com

Подпись Дашинимаева Э.Б. заверяю
Ученый секретарь ИБР РАН, к.б.н.



Хабарова М.Ю.