

**Отзыв официального оппонента  
руководителя 6 неврологического отделения ФГБНУ НЦН, доктора  
медицинских наук Захаровой Марии Николаевны 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 медицинских наук по  
специальности  
03.02.07 – Генетика**

**Актуальность темы выполненной работы**

Спинальная мышечная атрофия (СМА) – группа наследственных заболеваний, характеризующаяся прогрессирующей дегенерацией нижних мотонейронов и, как следствие, развитием периферического тетрапареза. Распространённость СМА составляет 1:6000-1:10000 новорождённых, из них около половины не достигают двухлетнего возраста. В основе СМА лежат мутации в 7 экзоне гена SMN1. Предприняты попытки изучения патогенеза СМА на биологических моделях, однако их недостатком является несоответствие клинических проявлений заболевания у пациентов и у модельных животных. Это связано с тем, что у последних есть ген *smn*, соответствующий гену SMN1 и отсутствует аналог гена SMN2.

Для точного воспроизведения фенотипа заболевания в настоящее время разрабатываются клеточные модели мотонейронов, дифференцированных из пациент-специфичных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК), которые позволяют исследовать патогенетические механизмы, приводящие к гибели мотонейронов не только при СМА, но и при других нейродегенеративных заболеваниях.

Поэтому тема диссертации Валетдиновой Камилы Робертовны «Получение модельной системы спинальной мышечной атрофии на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека», актуальна как в научном, так и практическом плане.

### **Достоверность и новизна результатов работы.**

Поставленная в начале работы цель достигнута благодаря корректному планированию и моделированию научного исследования. В результате проведенного изучения получены новые данные. Адекватная обработка данных и применение комплекса современных математических методов, позволили автору получить и охарактеризовать модель на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека для исследования СМА.

Впервые создана модельная система СМА I и II типов на основе ИПСК, репрограммированных при помощи эписомных векторов. Данные вектора представляют собой кольцевые молекулы ДНК, которые практически не интегрируются в геном, что позволяет обеспечивать временную экспрессию факторов репрограммирования.

### **Научная и практическая значимость.**

В результате работе получена модельная система СМА I и II типов: соответствующие линии ИПСК демонстрируют генотип СМА I типа: гомозиготная делеция 7 экзона гена SMN1, 2 копии гена SMN2, СМА II типа – делеция 7 экзона гена SMN1, 3 копии гена SMN2, а также нормы – отсутствие делеции в гене SMN1, 1 копия гена SMN2. При этом кариотип полученных линий ИПСК наиболее близок к норме на ранних пассажах культивирования, в случае более длительного культивирования увеличивается количество анеуплоидных клеток. Кроме того, направленная дифференцировка полученных линий ИПСК в моторные нейроны приводит к появлению клеток, демонстрирующих экспрессию основных маркеров двигательных нейронов. Особенностью данной системы является пациент-специфичность.

Данная система позволяет всесторонне исследовать молекулярно-биологические, генетические и клеточные механизмы развития спинальной мышечной атрофии. Кроме того, на данной модели возможно проводить токсикологические и доклинические фармакологические исследования, в том

числе скрининг больших панелей потенциальных лекарственных соединений. В перспективе на базе данной панели возможно создание высокоэффективных и безопасных методов исправления мутаций, вызывающих СМА.

### **Объем и структура диссертации.**

Диссертация построена по классическому плану, содержит введение, обзор литературы, главу, посвященную материалам и методам исследования, главу, содержащую результаты исследования и обсуждение, выводы, список литературы.

Введение обосновывает актуальность, цель и задачи исследования, его новизну и практическую значимость.

Первая глава посвящена обзору современной литературы по исследуемой теме. Здесь автор продемонстрировал глубокое знание изучения проблемы, осветил основные данные, полученные отечественными и зарубежными авторами.

Во второй главе представлены сведения об организации исследования, его методах и объеме. Автором последовательно описаны этапы создания модели: получение ИПСК, их дифференцировка с помощью эписомных векторов, а также характеристика полученных клеточных линий.

Третья глава, посвященная собственным результатам, весьма интересна и объемна. Здесь представлены результаты лабораторных исследований, причем имеется богатый иллюстративный материал. В предоставленной работе получена новая модельная система, состоящая из клеток больных СМА I и II типа и здоровых лиц.

Полученные линии ИПСК успешно прошли тесты на плюрипотентность, включая тератомный тест. Эффективность репрограммирования, достигнутая в данном исследовании, оказалась на порядок выше, чем в исходных протоколах (0,1% против 0,01%). Встройка эписомного вектора в геном в одной iSMA6L линии ИПСК ограничила использование данной линии в направленной дифференцировке ИПСК в мотонейроны.

При получении зрелых двигательных нейронов из ИПСК были использованы современные подходы с помощью комбинации малых молекул и ингибитора сигнального пути NOTCH – Compound E. Однако средняя эффективность дифференцировки (56%) была достоверно ниже, чем в исходном протоколе. Это подтверждается более низким числом клеток PAX6+ (71%) и OLIG2+ (54%). Автор предполагает получение наряду с мотонейронами дифференцировку другого типа нейронов (например, интернейронов), что требует дальнейшего изучения.

Выявлены отклонения в фенотипе мотонейронов, полученных из ИПСК пациентов с СМА I типа: сниженная жизнеспособность по сравнению с контрольными линиями, что подтвердило релевантность данной клеточной модели и возможность использования их в изучении этиопатогенеза СМА.

**Выводы логичны и вытекают из результатов исследования**

Работа написана хорошим научным языком, охватывает все аспекты изучаемой проблемы, свидетельствует о глубоком профессиональном знании автором анализируемой проблемы и полном овладении методологией научного исследования. Принципиальных замечаний к работе нет, однако имеются незначительные стилистические погрешности.

**Сведения о полноте опубликованных научных результатов**

По теме диссертации опубликовано 5 научных работ, в том числе 2 печатные работы в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ. Сделано 2 научных доклада на конференциях с международным участием.

**Соответствие автореферата основным положениям диссертации**

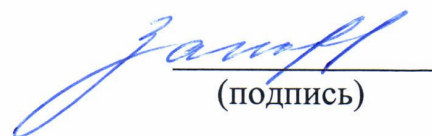
Автореферат диссертации Валетдиновой К.Р. соответствует основным положениям диссертации, в нем отражены актуальность темы, научная новизна, практическая значимость, основные результаты и их обсуждение, выводы и практическая значимость.

В заключение следует отметить, что диссертация Валетдиновой К.Р. «Получение модельной системы спинальной мышечной атрофии на основе

индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека», является завершённой научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной задачи – создание новой клеточной модели СМА, что имеет существенное значение для молекулярной биологии, генетики, а в перспективе и для практической неврологии.

По своей актуальности, новизне, научно-практической значимости диссертация Валетдиновой Камилы Робертовны на тему «Получение модельной системы спинальной мышечной атрофии на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека» полностью соответствует критериям пп. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 года №842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а её автор Валетдинова Камила Робертовна заслуживает присуждения искомой степени по специальности 03.02.07 – генетика.

Захарова Мария Николаевна, д.м.н.,  
руководитель 6 неврологического отделения,  
ФГБНУ НЦН  
125367 г. Москва, Волоколамское шоссе, д.80  
Тел.: +7(495) 490-24-13  
E-mail: center@neurology.ru

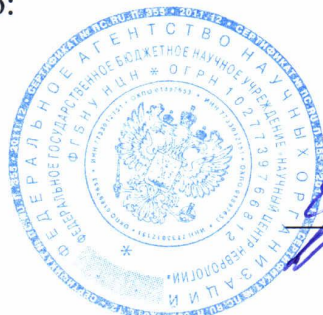
  
(подпись)

Даю согласие на сбор, обработку и хранение персональных данных

  
(подпись)

Подпись д.м.н., Захаровой М.Н. заверяю:  
Евдокименко Анна Николаевна  
Ученый секретарь ФГБНУ НЦН,  
к.м.н.

« 17 » января 20 17 г.



  
(подпись)