

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 003.011.01
НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО
НАУЧНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ЦЕНТР ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ И ГЕНЕТИКИ СИБИРСКОГО
ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»
ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ
КАНДИДАТА БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК

Аттестационное дело № _____

Дата защиты 08 февраля 2017 г. протокол № 1

О присуждении **Валетдиновой Камиле Робертовне**

ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Получение модельной системы спинальной мышечной атрофии на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека» по специальности 03.02.07 – генетика принята к защите 12.10.2016, протокол № 24 диссертационным советом Д 003.011.01 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», (630090, пр. ак. Лаврентьева, 10). Диссертационный совет Д 003.011.01 утвержден ВАК 15.01.2010 г., приказ ВАК № 1-7 и переутвержден Министерством образования и науки РФ 11.04.2012 года, приказ № 105/нк.

Соискатель: Валетдинова Камилла Робертовна, 1991 года рождения. В 2013 году Валетдинова К.Р. окончила Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Челябинский государственный университет», г. Челябинск.

С 01.09.2013 г. по 31.08.2016 г. Валетдинова К.Р. обучалась в очной аспирантуре ИЦиГ СО РАН, г. Новосибирск. В настоящее время Валетдинова К.Р. работает в должности младшего научного сотрудника в лаборатории

эпигенетики развития ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук».

Диссертация выполнена в лаборатории эпигенетики развития ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук».

Научный руководитель: **Закиян Сурен Минасович** – доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией эпигенетики развития ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск.

Официальные оппоненты:

1. **Гуляева Людмила Федоровна** – доктор биологических наук, профессор, руководитель лаборатории молекулярных механизмов канцерогенеза ФГБНУ «Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики», г. Новосибирск.

2. **Захарова Мария Николаевна** – доктор медицинских наук, руководитель 6 неврологического отделения ФГБНУ «Научный центр неврологии», г. Москва.

Оппоненты дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН», г. Москва. В положительном заключении, подписанном научным сотрудником ФГБУН «Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН», к.б.н. Дашинимаевым Э.Б., и утвержденном директором ФГБУН «Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН», член-корр. РАН, д.б.н. Васильевым А.В., указано, что «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 Правительства Российской Федерации, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор, Валетдинова Камила Робертовна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика. Отзыв заслушан, обсужден и утвержден на заседании объединенного семинара профильных лабораторий ФГБУН «Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН» по специальности 03.02.07 – генетика 16 декабря 2016 г., протокол № 4.»

Соискатель имеет 14 опубликованных работ, из них по теме диссертации 5 работ, общим объемом 31 страница, в том числе 2 статьи, опубликованные в научных рецензируемых изданиях и 3 тезиса в материалах всероссийских с международным участием конференций.

Наиболее значительные статьи по теме диссертации:

1. **Валетдинова К.Р.**, Медведев С.П., Закиян С.М. Модельные системы болезней двигательных нейронов – платформа для изучения механизмов патогенеза и поиска терапевтических средств // Acta Naturae. 2015. Т.7. №1(24). С. 92-109.

2. Григорьева Е.В., **Валетдинова К.Р.**, Устьянцева Е.И., Шевченко А.И., Мазурок Н.И., Маретина М.А., Куранова М.Л., Киселев А.В., Баранов В.С., Закиян С.М. Дифференцировка в нейральном направлении пациент-

специфичных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток от больных с наследственной формой спинальной мышечной атрофии // Гены и клетки. 2016. Т. XI. № 2. С. 70-79.

На диссертацию и автореферат поступило 19 отзывов, все положительные. Отзывы прислали:

1. Агладзе К.И. – к.ф.-м.н, проф., заведующий лабораторией биофизики возбудимых систем МФТИ (г. Москва).

2. Александрова М.А. - д.б.н., руководитель группы экспериментальной нейробиологии лаборатории проблем регенерации ФГБУН «Институт биологии развития им. Кольцова РАН» (г. Москва).

3. Арутюнян Р.М. – член-корр. Национальной академии наук Армении, д.б.н., проф., заведующий кафедрой генетики и цитологии Ереванского государственного университета (г. Ереван).

4. Асланян М.М. – д.б.н., проф. кафедры генетики биологического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова (г. Москва).

5. Григорян Э.Н. – д.б.н., г.н.с., и.о. заведующего лабораторией проблем регенерации ФГБУН «Институт биологии развития им. Кольцова РАН» (г. Москва).

«При работе с клетками человека (от пациентов со СМА I и II типа и здоровых людей) в автореферате не указаны правила биоэтики и мера их соблюдения автором работы. Не указан также возраст доноров клеток, т.е. один из факторов, существенно влияющих на свойства ИПСК, в частности их эпигенетическую сигнатуру (Lo Sarado et al., 2016). На рисунке 1 отсутствуют стрелки и масштабные линейки. Здесь же очевидно, что на щелочную фосфатазу окрашены другие, отличные от приведенных для демонстрации морфологии, образцы культур, но на это не указано в подрисуночной подписи. Возникает вопрос это одни и те же или разные линии клеток (внутри одной серии). Сходное замечание – отсутствие стрелок и линеек – может быть отнесено и к рисункам 2Б, 3, 4 и 8. На рисунке 4 не указаны способы

окрашивания тератом для определения типов клеток и тканей. В автореферате отсутствует указанный в тексте рисунок 9. Отмечу также, что при определении характера эмбрионидных телец, как правило, использованы два маркера дифференцировки зародышевых листков методом ПЦР и ИГХ, что позволяет только осторожное суждение о природе клеточных образований *in vitro*, к слову, в ряде случаев названных в тексте автореферата «эмбрионидными». Вместо слова «вектора» следует писать «векторы».

6. Гусев О.А. – к.б.н., в.н.с. лаборатории OpenLab Экстремальная биология Института фундаментальной медицины и биологии Казанского федерального университета (г. Казань).

«В качестве замечания необходимо отметить следующее: в представлении работы важно сделать более сильный акцент на новизне и преимуществе полученной автором модельной системы СМА по сравнению с уже известными данными по созданию клеточных линий ИПСК из фибробластов кожи больных спинальной мышечной атрофией (Ebert et al., 2009, Sareen et al., 2012)».

7. Дыбан П.А. – д.м.н., в.н.с. отдела молекулярной генетики ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины» (г. Санкт-Петербург).

8. Иллариошкин С.Н. – член-корр. РАН, д.м.н., проф., зам. директора по научной работе, заведующий отделом исследований мозга ФГБНУ «Научный центр неврологии» (г. Москва).

9. Лядова И.В. – д.м.н., в.н.с., зав. лабораторией биотехнологии ФГБНУ «ЦНИИТ» (г. Москва).

10. Макаревич П.И. – к.м.н., с.н.с. лаборатории генно-клеточной терапии Института регенеративной медицины Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова (г. Москва).

11. Маргулис Б.А. – д.б.н., и.о. зав. отделом клеточных культур ФГБУН Института цитологии РАН (г. Санкт-Петербург).

«В качестве замечания хочется указать автору на то, что в разделе «Научная новизна работы» она не привела аргументов в пользу этой самой

новизны, ссылаясь на то, что новой является «сама модельная система, состоящая из ИПСК пациентов со СМА I и II типов и здорового человека». Может, стоило раскрыть этот тезис глубже».

12. Микаелян А.С. – к.б.н., заведующий группой молекулярно-генетических механизмов онтогенеза ФГБУН «Институт биологии развития им. Кольцова РАН» (г. Москва).

«К незначительным замечаниям следует отнести отсутствие информации о количестве клеток фибробластов кожи пациентов, изначально взятых для создания ИПСК».

13. Никитина Т.В. – к.б.н., научный сотрудник лаборатории цитогенетики Научно-исследовательского института медицинский генетики ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН» (г. Томск).

14. Парфенова Е.В. – д.м.н., проф., руководитель лаборатории ангиогенеза ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» МЗ РФ (г. Москва).

15. Салмина А.Б. – д.м.н., проф., руководитель НИИ молекулярной медицины и патобиохимии ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» МЗ РФ (г. Красноярск).

16. Симонова О.Б. – к.б.н., заведующая лабораторией регуляции морфогенеза ФГБУН «Институт биологии развития им. Кольцова РАН» (г. Москва).

17. Чайлахян Р.К. – д.м.н., заведующий лабораторией стромальной регуляции иммунитета ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» МЗ России (г. Москва).

18. Чехонин В.П. – академик РАН, руководитель отдела фундаментальной и прикладной нейробиологии ФМИЦМН Минздрава России (г. Москва).

19. Чуриков Н.А. – д.б.н., проф., заведующий лабораторией

эпигенетических механизмов регуляции экспрессии генов ИМБ РАН (г. Москва).

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается тем, что официальные оппоненты являются компетентными специалистами в области генетики, имеют публикации в ведущих биологических журналах и дали свое письменное согласие быть оппонентами. Ведущая организация является одним из ведущих Институтов в нашей стране по изучению плюрипотентных клеток человека, способов их дифференцировки и исследования с их помощью механизмов развития наследственных заболеваний человека, в том числе нейродегенеративных заболеваний.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований разработана новая модель для изучения спинальной мышечной атрофии, состоящая из серии уникальных линий индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, полученных от пациентов с наследственной формой данного заболевания. **Предложен** новый более эффективный вариант протокола репрограммирования дифференцированных клеток к плюрипотентному состоянию с помощью эписомных векторов. **Доказано**, что полученные из фибробластов индуцированные плюрипотентные стволовые клетки человека действительно являются плюрипотентными, направленная дифференцировка которых приводит к формированию зрелых моторных нейронов.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что впервые **проведена** направленная дифференцировка индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, полученных из фибробластов пациентов с наследственной формой спинальной мышечной атрофии I и II типа с помощью эписом, в моторные нейроны.

Изучен и оценен статус плюрипотентности клеточных линий, полученных в результате репрограммирования фибробластов, в системе *in vitro*. **Доказано**, что полученные культуры являются плюрипотентными

стволовыми клетками и имеют соответствующую морфологию, характерный профиль экспрессии генов, участвующих в поддержании самообновления и плюрипотентности, а также несут признаки генетических aberrаций, связываемых с развитием спинальной мышечной атрофии.

Изучен процесс направленной и спонтанной дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток в системах *in vitro* и *in vivo*. **Доказано**, что направленная дифференцировка сопровождается последовательной активацией экспрессии генов *SOX1*, *PAX6* и *OLIG2*, маркеров ранних и более поздних стадий нейральной дифференцировки, и приводит к появлению клеток, демонстрирующих паттерн экспрессии генов (*HB9*, *ISL1*, *CHAT*), характерный для зрелых моторных нейронов.

Доказано, что спектр дифференцированных производных, полученных в результате спонтанной дифференцировки индуцированных клеточных линий, представлен производными трех зародышевых листков – экто-, эндо- и мезодермы.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что **разработан** комплексный подход, направленный на создание и характеристику модельной системы наследственного заболевания на основе дифференцированных производных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека.

Определены оптимальные условия для эффективного репрограммирования фибробластов к плюрипотентному состоянию с помощью эписомных векторов, обеспечивающих временную экспрессию факторов репрограммирования.

Созданы уникальные линии индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека с наследственной формой спинальной мышечной атрофии, которые полностью охарактеризованы и могут быть использованы для изучения патогенетических механизмов, приводящих к избирательной гибели моторных нейронов спинного мозга при данном заболевании, а также для тестирования потенциальных лекарственных соединений.

Полученные теоретические знания, разработанные методы и подходы, а также клеточные линии, моделирующие наследственную форму мышечной дистрофии человека, могут быть использованы в научно-исследовательских и медицинских учреждениях, связанных с изучением наследственных патологий человека, а также в образовательном процессе при подготовке специалистов в области генетики, клеточной биологии и регенеративной медицины.

Применительно к проблематике диссертации результативно использован новый подход к репрограммированию дифференцированных клеток к плюрипотентному состоянию, а также классические методы культивирования клеток в сочетании с иммуногистохимическими и молекулярно-генетическими методами, с помощью которых получена и охарактеризована новая модельная система спинальной мышечной атрофии.

Оценка достоверности результатов исследования выявила высокую воспроизводимость полученных данных и наличие всех необходимых экспериментальных контролей. В работе использованы молекулярно-генетические, цитогенетические и морфологические методики для характеристики клеточной модели заболевания, адекватные поставленным задачам. Результаты экспериментальных этапов работы получены с использованием современного сертифицированного оборудования для флуоресцентной и световой микроскопии, полимеразной цепной реакции в реальном времени и могут быть использованы другими исследователями.

Интерпретация результатов направленной дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека в моторные нейроны, **учитывает данные, полученные ранее** другими исследователями по рассматриваемой тематике.

Личный вклад автора состоит в непосредственном участии в научных экспериментах на всех этапах работы: получении пациент-специфичных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, характеристике особенностей экспрессии генов в полученных клеточных культурах,

характеристике динамики элиминации эписомной ДНК, обеспечивающей транзиторную экспрессию факторов репрограммирования, спонтанной дифференцировке в системе *in vitro* и *in vivo*, дифференцировке плюрипотентных клеток в моторные нейроны, в обобщении полученных данных, анализе и интерпретации результатов, апробации материала и подготовке публикаций.

Полученные соискателем научные результаты соответствуют п. 13. «Генетика соматических клеток» и п. 17. «Генетика человека. Медицинская генетика. Наследственные болезни» паспорта специальности 03.02.07 – генетика.

Диссертационным советом сделан вывод о том, что диссертация представляет собой законченную научно-квалификационную работу, соответствует критериям пункта 9, абзац 2 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденным постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 21 человек, из них 6 докторов наук по специальности рассматриваемой диссертации, участвующих в заседании, из 27 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за— 21, против— нет, недействительных бюллетеней — нет.

Председатель
диссертационного совета,
академик РАН



В.К. Шумный

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

Т.М. Хлебодарова

10.02.2017 г.