

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора биологических наук, профессора Айдагуловой Светланы Владимировны
на диссертацию Сульдиной Любови Александровны
«Особенности ультраструктурной организации клеток человека с увеличенным
числом CAG повторов в гене *HTT*, полученных от пациентов с болезнью
Хантингтона или в результате генетической модификации»
на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 1.5.22 – клеточная биология

Актуальность темы диссертационного исследования. Ультраструктурные изменения цитоплазматических органелл клеток, которые можно наблюдать в электронный микроскоп, позволяют объективно и наглядно оценивать биологические процессы, по крайней мере, дифференцировать свойственные норме и патологии феномены. Электронная микроскопия является одним из важных методов клеточной биологии и по-прежнему актуальна, поскольку с высоким разрешением иллюстрирует молекулярные события, происходящие на уровне структурной биологии, выражающиеся в сложных сочетаниях универсальных и специфических формообразовательных реакций. Целью диссертационного исследования Л.А. Сульдиной является выявление и изучение последствий увеличения числа CAG повторов в гене *HTT*, кодирующем белок хантингтин, в ультраструктурной организации клеток и цитоплазматических органелл с использованием различных клеточных моделей болезни Хантингтона.

Несмотря на 150-летний юбилей с даты описания Джорджем Хантингтоном тяжелой нейродегенеративной болезни, носящей его имя, и последующего всестороннего изучения болезни Хантингтона, эффективное лечение пациентов до сих пор не разработано несмотря на всесторонние глубокие научные исследования и обоснование множества аспектов в патогенезе, включая транскрипционную дисрегуляцию, митохондриальную дисфункцию, эксайтотоксичность, дофаминергический дисбаланс, метаболические дефекты, нейровоспаление и др.

Внимание автора диссертационного исследования привлекло преимущественное поражение шипиковых нейронов полосатого тела в центральной нервной системе при болезни Хантингтона наряду с изменениями клеток, возникающими при повышении количества CAG повторов в гене *HTT* до уровней, редко встречающихся у пациентов. Как известно, это наследственное нейродегенеративное заболевание характеризуется прогрессирующими двигательными, когнитивными и психическими нарушениями у пациентов. Болезнь обусловлена мутацией в полном белке массой 350 кДа, экспрессируемом во всех клетках, и манифестирует при размере тракта в 40 CAG у гетерозигот. Наблюдают эффекты мутантного хантингтина на самых ранних стадиях развития

патологии у пациентов и в модельных системах, и понимание функций хантингина важно как для фундаментальных аспектов клеточной биологии, так и для создания средств, нацеленных на лечение заболевания.

Как и при других амилоидных заболеваниях, мутантный белок образует фибриллярные структуры, которые при болезни Хантингтона обнаруживаются в нейронах пациентов. Внутриклеточные отложения связаны с нарушением регуляции жизненно важных процессов, а межнейронный транспорт агрегатов может способствовать прогрессированию заболевания. Однако понимание молекулярных изменений и их неблагоприятного воздействия затруднено недостатком ультраструктурных данных, в т.ч. в зависимости от количества CAG повторов.

Таким образом, несмотря на идентификацию и характеристику причинного гена и мутации, а также значительный прогресс в нашем понимании клеточной патологии за последние годы, патогенетически обоснованная терапия, влияющая на уже известные молекулярные мишени и облегчающая состояние пациентов с болезнью Хантингтона, по-прежнему отсутствует. В теоретическом аспекте болезнь Хантингтона представляет собой уникальную возможность для детального анализа на ультраструктурном уровне лежащих в ее основе патологических процессов. Благодаря своему преимущественно моногенному происхождению, степень экспансии CAG повторов определяет возраст начала заболевания. Тем не менее, до недавнего времени влияние мутантного белка хантингина с расширенным полиглутаминовым доменом не было проанализировано на ультраструктурном уровне в сравнительном аспекте в зависимости от увеличения числа CAG повторов в гене *HTT*. Тема кандидатской диссертации актуальна, фундаментальна, востребована и рассматривает круг вопросов, не освещенных в научной литературе.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. Электронно-микроскопическое и морфометрическое исследование выполнено на клеточных моделях болезни Хантингтона, полученных в лабораториях соавторов с помощью современных методов клеточной биологии: две пациент-специфичных культуры нейронов (MA2 и Че3) с малым количеством CAG повторов, полученные методом направленной дифференцировки из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, которые, в свою очередь, были получены из фибробластов 2-х пациенток с клинически диагностированной болезнью Хантингтона, с соответствующими контролями. Кроме того, исследованы средние шипиковые нейроны линий 69Q9T и 69Q25L со встройкой 69 CAG повторов в ген *HTT*, полученные с использованием

системы редактирования генома CRISPR/Cas9 и метода направленной дифференцировки, а также контрольные линии клеток MAIL (изогенная) и r2LF (неизогенная), содержащие 20-22 CAG повтора в гене *HTT*. Третья модель - клоны 6Н и F1 клеток эмбриональной почки человека (НЕК293), содержащие 100-150 CAG повторов в гене *HTT*. Все клеточные модели исследованы по сравнению с соответствующими контрольными группами.

Для получения результатов диссертантом освоены современная приборная база, использованы реактивы ведущих фирм-производителей, что подробно отражено в разделе «Материалы и методы». Результаты морфометрического исследования проанализированы с помощью адекватных методов статистической обработки. Сформулированные выводы отвечают поставленным цели и задачам диссертационного исследования.

Достоверность и новизна научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. Достоинством диссертации является изучение нескольких мембранных органелл в различных клеточных культурах, различающихся количеством CAG повторов в их геноме, что и явилось целью настоящего сравнительного исследования. Сложность исследования и интерпретации полученных данных связаны с тем, что белок хантингтин выполняет множество функций и взаимодействует с более чем 100 другими белками. Заболевание обусловлено расширением полиглутаминового (polyQ) тракта в экзоне 1 белка хантингтина (НТТ), что приводит к аномальному фолдингу белка, накоплению нерастворимых агрегатов внутри клеток и нарушению клеточных функций. Неправильная агрегация фрагментов мутантного белка, кроме того, вероятно, способствует токсичности и приводит к дисфункции из-за секвестрации хантингтина и других взаимодействующих с ним белков и фосфолипидов.

С учетом вышеперечисленного, впервые проведен сравнительный анализ и охарактеризованы ультраструктурные изменения органелл в клетках с различным увеличенным числом CAG повторов в гене *HTT*: пациент-специфичных нейронах (42-47 CAG повторов); генетически модифицированных нейронах (69 CAG повторов) и клетках НЕК293 (100-150 CAG повторов). Показано, что клетки с увеличенным числом CAG-повторов в гене *HTT* характеризуются универсальными нарушениями ультраструктуры 3-х мембранных органелл: эндоплазматического ретикулума (ЭПР), митохондрий и аутолизосом. Продемонстрирована корреляция между увеличением до 69 числа CAG повторов в гене *HTT* в генетически модифицированных нейронах и появлением нарушений в организации синапсов, дендритов и шипиков, а также ростом числа гибнущих клеток.

Наряду с универсальными закономерностями, в работе выделены и оценены

морфометрически специфические ультраструктурные изменения мембранных органелл. Так, впервые в цитоплазме клеток НЕК293 со 100-150 САG повторами в гене *HTT* выявлены четырехслойные мембраны, сформировавшиеся в результате адгезии двух цистерн шероховатого ЭПР.

Впервые показано, что ингибитор депо-зависимых кальциевых каналов EVR4592 снижает количество дефектных митохондрий и аутолизосом в цитоплазме пациент-специфичных нейронов с 47 САG повторами в гене *HTT*.

Значимость для науки и практики результатов диссертации соискателя и возможность конкретных путей их использования. Как известно, многие неизлечимые нейродегенеративные расстройства связаны и потенциально вызваны амилоидогенной аномальной упаковкой и агрегацией ряда белков. Результаты исследования являются прекрасной иллюстрацией закона диалектики, согласно которому «количество переходит в качество», т.е. увеличение числа САG повторов приводит к прогрессивному увеличению измененных мембранных органелл культивируемых нейронов и клеток НЕК293, являющихся клеточными моделями болезни Хантингтона.

Результаты исследования предоставляют дополнительные важные аргументы в пользу гипотезы «митохондриального каскада», согласно которой дисфункция митохондрий способствует клеточной дегенерации, в частности, при нейродегенеративных заболеваниях.

С практической точки зрения, полученные Л.А. Сульдиной данные должны заинтересовать фармакологов и клиницистов-неврологов в плане поиска таргетного препарата, направленного для блокировки увеличенного числа повторов гена для лечения заболевания, быстро прогрессирующего и значительно снижающего качество жизни пациентов сравнительно более молодого возраста по сравнению с возрастом манифестации других нейродегенеративных заболеваний.

Качество оформления диссертационного исследования Л.А. Сульдиной в целом соответствует высоким стандартам представления результатов научно-исследовательских работ. В структуре диссертации имеются введение, литературный обзор, подробное описание материалов и методов, описание результатов собственных исследований, обсуждение результатов, заключение, выводы и список литературы. Иллюстрации высокого разрешения и качества размещены в сравнительном аспекте с контрольными образцами в виде монтажей.

Диссертация заслуживает высокой оценки. Автореферат полностью отражает содержание диссертации. Результаты полностью опубликованы в высокорейтинговых рецензируемых журналах, представлены в материалах международных и российских конференций по клеточной биологии.

Принципиальных замечаний к диссертации нет. В порядке уточнения и дискуссии к автору диссертации имеется 3 вопроса и 1 замечание.

1. Согласно 1-му положению, выносимому на защиту, в пациент-специфичных и генетически модифицированных нейронах «выраженность нарушений структурной организации цитоплазматических органелл - шероховатого и гладкого ЭПР, митохондрий и аутолизосом, а также структур, отвечающих за передачу нервного сигнала – дендритов, шипиков и синапсов, зависит от числа повторов СAG». Однако в таблице 2, без статистической оценки обобщающей «уровень изменений доли дефектных митохондрий и митохондрий, контактирующих с ЭПР, а также относительного числа аутолизосом», обращает на себя внимание наибольшая выраженность изменений митохондрий именно в пациент-специфичных нейронах, и имеется паритет по количеству аутолизосом с клетками НЕК293. Следует ли из этого, что для изменения ультраструктуры митохондрий в изученных клеточных линиях важно не только количество СAG повторов, но и исходный «генетический паспорт» клеток, полученных непосредственно от пациентов с клиническим диагнозом болезни Хантингтона?

2. Почему при обработке кальциевых каналов показатели в контроле не изменились, а в пациент-специфичных нейронах уменьшилась доля дефектных митохондрий? О чем это свидетельствует?

3. Вызывают интерес выявленные в клетках НЕК293 окончательные мембраны. Какова роль этих органелл в других эукариотических клетках (по данным литературы, что не отражено в литобзоре), и могут ли они расцениваться как ультраструктурный эквивалент повышенного числа СAG повторов в клетках эпителиального (в данном случае мезодермального) происхождения?

4. В 3-м выводе нецелесообразно приводить фразу «может свидетельствовать...».

Заключение о соответствии диссертации требованиям Положения о присуждении ученых степеней. Диссертация представляет собой законченное оригинальное научное исследование, соответствующее паспорту специальности 1.5.22 – клеточная биология в нескольких разделах.

Диссертационное исследование Сульдиной Любови Александровны «Особенности ультраструктурной организации клеток человека с увеличенным числом СAG повторов в гене *HTT*, полученных от пациентов с болезнью Хантингтона или в результате генетической модификации», выполненное под руководством кандидата биологических наук Киселевой Елены Владимировны, является самостоятельной научно-квалификационной работой, проведенной на высоком научно-методическом уровне, в которой получен фактический материал,

и содержится решение научной задачи – на культуральных моделях болезни Хантингтона, различающихся количеством CAG повторов в гене *HTT*, изучены ультраструктурные особенности мембранных органелл и межклеточных контактов, что имеет существенное значение для клеточной биологии. Практическая значимость работы заключается в получении позитивного эффекта на ультраструктуру пациент-специфичных нейронов при блокировании кальциевых каналов, что может иметь значение для разработки подходов к лечению пациентов.

Диссертационное исследование Л.А. Сульдиной по актуальности, методическому уровню, новизне и значимости полученных результатов, выводов и полноте их опубликования отвечает требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г. (с изменениями в соответствии с Постановлением Правительства РФ № 335 от 21.04.2016 г., № 748 от 02.08.2016 г., № 650 от 29.05.2017 г., № 1024 от 28.08.2017 г. и № 1168 от 01.10.2018 г. «О внесении изменений в Положение о присуждении ученых степеней»), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор Л.А. Сульдина заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.22 – клеточная биология.

Официальный оппонент

Заведующий лабораторией клеточной биологии
и фундаментальных основ репродукции
Центральной научно-исследовательской лабораторией
ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный
медицинский университет» МЗ РФ
доктор биологических наук (1.5.22),
профессор по специальности
1.5.22 – клеточная биология
Телефон +7-913-909-22-51
e-mail: asvetvlad@yandex.ru



Айдагулова Светлана Владимировна

12 октября 2023 г.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России; 630091, Новосибирск, Красный проспект, 52, тел. +7(383)2223204; rectorngmu@yandex.ru

