

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
(МИНОБРНАУКИ РОССИИ)

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение  
"Научно-исследовательский институт  
нейронаук и медицины"  
(НИИНМ)

630117, Новосибирск, ул. Тимакова, 4

Тел.: (383) 335-98-55 Факс: (383) 335-97-54 E-mail: [inm@neuronm.ru](mailto:inm@neuronm.ru)

ОКПО 01898500, ОГРН 1025403649831, ИНН 5408106370, КПП 540801001

От 13.10.2023 № 33-07/234  
На № \_\_\_\_\_ от \_\_\_\_\_

**УТВЕРЖДАЮ**

Директор НИИНМ

д.м.н., профессор, академик РАН

Л.И. Афтанас

«13» октября 2023 г.

**ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ**

Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины»  
на диссертационную работу Сульдиной Любови Александровны  
«Особенности ультраструктурной организации клеток человека с  
увеличенным числом САG повторов в гене *HTT*, полученных от пациентов с  
болезнью Хантингтона или в результате генетической модификации»,  
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук  
по специальности 1.5.22. – клеточная биология

**Актуальность темы исследования**

Во всем мире отмечается неуклонный рост числа хронических нейродегенеративных заболеваний, что является актуальной медицинской и социальной проблемой, поскольку страдает работоспособное население, увеличивается число инвалидов, возрастают расходы на длительную терапию

и реабилитацию больных. К таким заболеваниям относится болезнь Хантингтона (БХ). Причиной развития БХ является увеличение числа СAG повторов в гене *HTT*, кодирующем белок хантингтин, что приводит к удлинению полиглутаминового тракта белка и вызывает агрегацию молекул мутантного хантингтина (mHtt) между собой и с другими белками. Агрегаты формируются как в цитоплазме, так и в ядрах клеток, что вызывает нарушение функций нейронов и их гибель. Нормальным количеством повторов считается 10-35, когда их число превышает 40, вероятность развития болезни у носителя близка к 100%. На сегодняшний день БХ имеет только симптоматическое лечение, позволяющее лишь на некоторое время несколько снизить темпы развития нейродегенерации. Таким образом, тщательное изучение патогенетических механизмов развития БХ, в т.ч. на клеточном уровне, и поиск новых мишеней и подходов для разработки патогенетической терапии является важным направлением биомедицинских исследований.

Исследования механизмов развития нейродегенеративных заболеваний тесно связаны с разработкой клеточных моделей, полученных как с использованием клеточного материала от пациентов, так и созданных с помощью методов редактирования генома. Функциональные изменения нейронов при БХ активно изучаются, однако, многие особенности развития этого заболевания, особенно на клеточном уровне, пока недостаточно исследованы, что является актуальной проблемой фундаментальной медицины.

Таким образом, диссертационная работа Сульдиной Л.А., посвященная исследованию особенностей организации клеток человека при увеличении числа СAG повторов в гене *HTT*, связанных с развитием БХ, является актуальной. Результаты работы позволяют более детально оценить нарушения структурной организации клеток с увеличенным числом СAG повторов в гене *HTT*, что необходимо для понимания механизмов

нейродегенерации при БХ и возможности регуляции этих процессов для разработки новых подходов к лечению патологии.

**Научная новизна исследования, полученных результатов и выводов, сформулированных в диссертации**

Представленные в работе Л.А. Сульдиной данные отличаются научной новизной, поскольку раскрывают ранее не описанные клеточные особенности формирования нейродегенерации при БХ. В результате сравнительного анализа различных клеточных культур с увеличенным числом CAG повторов в гене *HTT* впервые выявлены и охарактеризованы сходные нарушения органелл, а именно: шероховатого и гладкого ЭПР (везикуляция мембран); митохондрий (дефекты оболочек, крист и матрикса) и аутолизосом (нарушение целостности мембраны). 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. Впервые в цитоплазме генетически модифицированных клеток НЕК293 со 100-150 повторами в гене *HTT* выявлены 4-х-слойные мембраны, сформировавшиеся в результате взаимного слияния двух цистерн ЭПР. Впервые показано, что ингибитор депо-зависимых кальциевых каналов EVR4593 снижает количество дефектных митохондрий и аутолизосом в цитоплазме пациент-специфичных нейронов с увеличенным числом CAG повторов. Выводы, сформулированные в диссертационном исследовании, являются новыми и расширяют существующие представления о клеточных механизмах нейродегенерации при БХ.

**Степень обоснованности и достоверность научных положений и выводов, сформулированных в диссертации**

Обоснованность и достоверность полученных результатов и выводов обеспечены соответствующим дизайном исследования, грамотным использованием современных клеточных подходов и высокоразрешающей электронной микроскопии в сочетании с морфометрическим анализом

клеточных параметров. Статистический анализ выполнен корректно и отражает современный подход к проведению статистического анализа.

Сделанные автором выводы и выносимые на защиту положения основаны на полученных результатах. Материалы диссертационного исследования в необходимом объёме представлены в публикациях в рецензируемых зарубежных журналах. Полученные результаты были обсуждены на конференциях всероссийского уровня.

#### **Научная и практическая значимость полученных автором диссертации результатов**

Данная работа имеет значение для фундаментальной науки в области исследования клеточных механизмов нейродегенерации. Результаты диссертационного исследования Сульдиной Л.А. расширяют и углубляют существующие представления о субклеточных дефектах при нейродегенерации по типу БХ. Понимание клеточных механизмов и особенностей возникновения патологии сделает возможным разработку более эффективных стратегий лечения БХ.

#### **Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы**

Полученные результаты могут быть учтены в процессе разработки новых способов патогенетической терапии БХ, включая передовые клеточные технологии, в академических научных учреждениях биомедицинского профиля и для проведения доклинических исследований и скрининга лекарственных средств. Теоретические положения исследования могут быть использованы в курсах лекций и учебных пособиях для студентов биологических и медицинских факультетов ВУЗов.

#### **Общая оценка диссертации**

Диссертация построена по традиционному плану и содержит титульную страницу, оглавление, список сокращений, введение, 4 основные главы («Обзор литературы», «Материалы и методы исследования», «Результаты», «Обсуждение результатов»), заключение, выводы, список

цитируемой литературы. Материал диссертации изложен на 157 страницах машинописного текста, иллюстрирован 36 рисунками и 2 таблицами. Список цитируемой литературы включает 277 зарубежных источников и 1 отечественную статью, более 25% - ссылки на свежие результаты последних 5 лет (74 источника).

Во введении дана общая характеристика изучаемой проблематики: обозначены актуальность и значимость исследования, поставлена цель и сформулированы задачи, объяснена новизна полученных данных, постулированы выносимые на защиту положения. Кроме того, представлена информация об апробации работы и обозначен личный вклад соискательницы.

Литературный обзор соответствует теме диссертации и является информативным источником о патогенезе БХ (с упором на клеточные нарушения), структурной организации нейронов в норме и при нейродегенеративных заболеваниях, а также подходах и методах изучения механизмов нейродегенеративных заболеваний, включая БХ. Несомненным достоинством обзора является критичность изложения, а также акцентирование внимания на существующих пробелах в направлении исследований механизмов БХ. Представленный обзор свидетельствует о хорошем знании автором современных данных по исследуемой проблеме.

Методы исследования описаны подробно, адекватны поставленным задачам. Можно с уверенностью заключить, что работа выполнена на высоком современном методическом уровне. Краткая характеристика клеточных культур, использованных в работе, приведена в таблице.

Результаты проведенных экспериментов изложены на 58 страницах машинописного текста. Этот раздел иллюстрирован многочисленными рисунками с электронограммами и обобщающими диаграммами. Иллюстративный материал в полной мере отражает полученные результаты. Обсуждение результатов проведено диссертантом квалифицировано, что свидетельствует о его научной зрелости.

Автореферат соответствует тексту диссертации, публикации автора полно отражают основное содержание работы.

### **Замечания и вопросы по диссертации**

Существенных замечаний к оформлению работы, выбору методов исследования, изложению результатов нет. Однако в ходе прочтения диссертации возникли следующие *замечания*:

1) В тексте много опечаток.

2) Во Введении неверно указано число страниц диссертации. На С. 60 и 61 приведены два разных Рисунка под номером 11, отсутствует Рисунок 12, на который дается ссылка на С.57. На С.79. 4-я строка сверху: «...«атипичных» нейронов (Рис 22, г) шипики в среднем были вдвое длиннее». Но Рис.22 посвящен «Аномальному ультраструктурному строению синаптических окончаний...», тогда как «Анализ длины шипиков...» представлен на Рис.24. С.103-104: «Наши исследования показали, что в цитоплазме клеток с увеличенным числом САГ повторов в гене НТТ наблюдается более существенное, чем в норме, накопление небольших везикул размером около 30 нм вблизи цистерн ЭПР (Рис.6, Рис.17)». Но Рис.6 посвящен митохондриям: «Ультраструктурные дефекты митохондрий...». С.117: «Важную функцию в перемещении ионов  $Ca^{2+}$  в шипиках выполняет эндоплазматический ретикулум, стресс и функциональные нарушения которого при БХ продемонстрированы как в нашем исследовании, так и в работах других авторов (Красковская и др., 2021)». Ссылка на эту публикацию отсутствует в «Списке использованной литературы».

#### ***Вопросы:***

1) Белок НТТ (и mНТТ) широко экспрессируется в самых различных тканях, где выполняет различные функции. Есть ли данные о причинах/механизмах различной локализации НТТ в разных клетках: нейронах (ядро/цитоплазма) и соматических клетках (только цитоплазма)? Как обстоит этот вопрос в глиальных клетках?

2) Что известно о системе клиренса НТТ и mНТТ белков? Какие пептидазы участвуют в их преимущественной деградации? Играет ли аутофагия какую-либо сдерживающую позитивную роль при развитии патологии в нейронах с увеличенным числом СAG повторов в гене *НТТ*? С какого числа СAG повторов в гене *НТТ* начинает наблюдаться выраженный дефицит аутофагии?

Вышеизложенные замечания и вопросы не являются принципиальными, носят дискуссионный характер и не снижают значимости проведенного исследования.

### **Заключение**

Диссертационная работа Сульдиной Любови Александровны «Особенности ультраструктурной организации клеток человека с увеличенным числом СAG повторов в гене *НТТ*, полученных от пациентов с болезнью Хантингтона или в результате генетической модификации» является законченной научно-квалификационной работой, направленной на решение научной задачи определения особенностей организации клеток человека при увеличении числа СAG повторов в гене *НТТ*, связанных с развитием болезни Хантингтона.

По актуальности темы, новизне полученных данных и их научно-практической значимости, объему выполненных автором исследований диссертационная работа полностью соответствует требованиям пп. 9–14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 (с последующими редакциями), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а её автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.22. – клеточная биология.

Отзыв обсужден и одобрен на заседании Отдела клинической нейронауки поведения и нейротехнологий Федерального государственного

бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины» – Протокол № 1, от 7 сентября 2023 г.

Главный научный сотрудник, заведующая лабораторией экспериментальных моделей нейродегенеративных процессов Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины», доктор биологических наук

Тихонова М.А.

Главный научный сотрудник, заведующая лабораторией трансляционной биопсихиатрии, заместитель директора по научной работе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины», доктор биологических наук, доцент

Амстиславская Т.Г.

дата: 12.10.2023

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины».

630117, Российская Федерация, г. Новосибирск, ул. Тимакова, д.4. (383) 335-98-55. [inm@neuronm.ru](mailto:inm@neuronm.ru)

Подписи д.б.н. М.А. Тихоновой и д.б.н., доцента Т.Г. Амстиславской заверяю:

Ученый секретарь Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины», к.б.н.

Жанаева С.Я.

М.П.

