

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.239.01,
СОЗДАННОГО 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 № _____

решение диссертационного совета от 1 ноября 2023 г. № 32

О присуждении Сульдиной Любови Александровне
(гражданка РФ)

ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация Сульдиной Л.А. «Особенности ультраструктурной организации клеток человека с увеличенным числом CAG повторов в гене *HTT*, полученных от пациентов с болезнью Хантингтона или в результате генетической модификации» по специальности 1.5.22. – клеточная биология (биологические науки) принята к защите 25 августа 2023 г, протокол №24, диссертационным советом 24.1.239.01, созданным на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», (ИЦиГ СО РАН) (630090, Новосибирск, пр. акад. Лаврентьева, 10). Диссертационный совет 24.1.239.01 (Д 003.011.01) утвержден ВАК 15.01.2010, приказ ВАК № 1-7 и переутвержден Министерством образования и науки РФ 11.04.2012 года, приказ № 105/нк.

Соискатель: Сульдина Любовь Александровна, 21 февраля 1991 года рождения. В 2013 Сульдина Любовь Александровна окончила Новосибирский государственный университет, факультет естественных наук по

специальности «Биология» с квалификацией «специалист». В 2016 г. окончила очную аспирантуру ИЦиГ СО РАН. В период подготовки диссертации соискатель Сульдина Любовь Александровна работала в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» в должности младшего научного сотрудника.

Диссертационная работа выполнена в секторе структурной биологии клетки ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения российской академии наук», г. Новосибирск.

Научный руководитель – кандидат биологических наук Киселева Елена Владимировна, работает в должности ведущего научного сотрудника секторе структурной биологии клетки Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук».

Официальные оппоненты:

1. Айдагулова Светлана Владимировна, доктор биологических наук, профессор, заведующая лабораторией клеточной биологии и фундаментальных основ репродукции Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» МЗ РФ, г. Новосибирск.
2. Огиенко Анна Александровна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории клеточного деления ФГБУН Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, г. Новосибирск.

Оппоненты дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины», г. Новосибирск. В своем положительном отзыве, подписанном главным научным сотрудником, заведующей лабораторией экспериментальных моделей нейродегенеративных процессов ФГБУН НИИНМ д.б.н. Тихоновой Марией Александровной и главным научным сотрудником, заведующей лабораторией трансляционной биопсихиатрии, заместителем директора по научной работе ФГБУН НИИНМ д.б.н., доцентом Амстиславской Тамарой Геннадьевной указала что «Диссертационная работа Сульдиной Любови Александровны «Особенности ультраструктурной организации клеток человека с увеличенным числом САС повторов в гене *HTT*, 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 САС повторов в гене *HTT*, 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.»

Соискатель имеет 28 опубликованных работы, из них по теме диссертации 15, общим объемом 103 страницы, из них 6 статей в рецензируемых научных изданиях (Wos, Scopus) и 9 тезисов в материалах всероссийских и международных конференций. Во всех опубликованных работах личный вклад автора был определяющий. В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем работах.

Наиболее значительные публикации по теме диссертации:

1. **Suldina, L.A.**, Morozova, K.N., Malankhanova, T.B., Malakhova, A.A., Kiseleva, E. (2021). Electron microscopic analysis of autophagy in neurons with expanded CAG repeats in the huntingtin gene in patient-specific and transgenic cell model. *Cell Death Discov.* 7, 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41420-021-00587-w>
2. Malankhanova T., **Suldina L.**, Grigor'eva E., Medvedev S., Minina J., Morozova K., Kiseleva E., Zakiyan S., Malakhova A. (2020) Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Isogenic Model of Huntington's Disease Based on Neuronal Cells Has Several Relevant Phenotypic Abnormalities. *Journal of personalized medicine.* 10 (4) 215. <https://doi.org/10.3390/jpm10040215>
3. Grigor'eva E.V., Malankhanova T.B., Surumbayeva A., Pavlova S.V., Minina J.M., Kizilova E.A., **Suldina L.A.**, Morozova K.N., Kiseleva E., Sorokoumov E.D., Lebedev I.N., Malakhova A.A., Zakian S.M. (2020) Generation of GABAergic striatal neurons by a novel iPSC differentiation protocol enabling scalability and cryopreservation of progenitor cells. *Cytotechnology.* 72, 649–663. <https://doi.org/10.1007/s10616-020-00406-7>
4. **Suldina L.A.***, Morozova K.N*., Malankhanova T.B., Grigor'eva E.V., Zakian S.M., Kiseleva E., Malakhova A.A. (2018). Introducing an expanded CAG tract into the huntingtin gene causes a wide spectrum of ultrastructural defects in cultured human cells. *PLOS ONE.* 13(10), e0204735 Doi: 10.1371/journal.pone.0204735. *-равный вклад авторов

5. Morozova K.N., **Suldina L.A.**, Malankhanova T.B., Grigor'eva E.V., Zakian S.M., Kiseleva E., Malakhova A.A.. (2018). Ultrastructural defects in isogenic lines of human cells with expanded CAG repeats in the huntingtin gene obtained via the CRISPR/Cas9 technology. *Гены и клетки*. 2, 77.
6. Nekrasov E. D., Vigont V. A., Klyushnikov S. A., Lebedeva O. S., Vassina E. M., Bogomazova A. N., Chestkov I. V., Kostrjukova E. S., Kiseleva E., **Suldina L. A.**, Zimina O. A., Ryazantseva M. A., Skopin A. Yu., Illarioshkin S. N., Kaznacheyeva E. V., Lagarkova M. A., Kiselev S. L.. (2016) Manifestation of Huntington's disease pathology in human induced pluripotent stem cell-derived neurons. *Molecular neurodegeneration* 11(1), 27-. Doi: 10.1186/s13024-016-0092-5

На диссертацию и автореферат поступило 10 отзывов, из них 9 без замечаний.

Отзывы прислали:

1. Бгатова Наталия Петровна – д.б.н., профессор, заведующая лабораторией ультраструктурных исследований Научно-исследовательского института клинической и экспериментальной лимфологии – филиала ФГБНУ «ФИЦ ИЦиГ СО РАН», г. Новосибирск.
2. Лихошвай Елена Валентиновна – д.б.н., профессор, главный научный сотрудник, заведующая отделом ультраструктуры клетки ФГБун Лимнологического института СО РАН, г. Иркутск
и Клименков Игорь Викторович – д.б.н., доцент ведущий научный сотрудник отдела ультраструктуры клетки ФГБУН Лимнологического института СО РАН, г. Иркутск.
3. Юдкин Д.В. – к.б.н., зав отделом геномных исследований ФГБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р.п.Кольцово
4. Дубинина Наталья Николаевна - к.б.н., доцент кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии им. проф. М.Я. Субботина ФГБОУ ВО НГМУ Минздрава России, г. Новосибирск.

5. Толмачева Екатерина Николаевна – к.б.н., н.с. лаборатории цитогенетики научно-исследовательского института медицинской генетики ФГБНУ «Томский НИМЦ», г. Томск.
6. Жукова Мария Владимировна – к.б.н., с.н.с. лаборатории регуляции экспрессии генов в развитии ФГБУН Институт биологии гена РАН, г. Москва.
7. Пчицкая Екатерина Игоревна – к.ф-м.н., н.с. лаборатории молекулярной нейродегенерации, доцент Высшей школы биомедицинский систем и технологий, ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого», г. Санкт-Петербург.
8. Курушина Ольга Викторовна – д.м.н., доцент, зав. кафедрой неврологии, нейрохирургии, медицинской генетики ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Волгоград.
9. Гуляева Людмила Фёдоровна – д.б.н., руководитель лаборатории молекулярных механизмов канцерогенеза ФГБНУ ФИЦ ФТМ, г. Новосибирск.
10. Рогачевский Вадим Валерьевич – к.б.н., в.н.с., и.о. зав. лаборатории методов электронной микроскопии ИБК РАН (обособленного подразделения ФИЦ ПНЦБИ РАН), г. Пущино. В отзыве высказаны серьезные критические замечания по выбору модели болезни Хантингтона на основе клеточных культур, а также замечания относительно идентификации органелл в нейроноподобных клетках человека.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается тем, что оппоненты являются компетентными специалистами в области клеточной биологии, ультраструктурной организации клеток и генетики, имеют публикации в ведущих биологических журналах и дали свое письменное согласие быть оппонентами. Ведущая организация является

одним из ведущих учреждений в области нейробиологии, что позволяет произвести экспертную оценку полученных в диссертационной работе результатов.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований доказано, что организация нейроноподобных клеток, полученных на основе клеток пациентов с болезнью Хантингтона (Гентингтона) или в результате генетической модификации, а также генетически модифицированных клеток линии НЕК293 с увеличенным числом CAG повторов в гене *HTT*, кодирующем белок хантингтин, характеризуется схожими нарушениями структурной организации трёх функциональных групп органелл, а именно: везикуляцией шероховатого и гладкого эндоплазматического ретикулума (ЭПР), дефектами оболочки и крист митохондрий, а также увеличением в клетке числа аутолизосом и нарушением целостности их мембраны.

Доказано, что существует корреляция между числом CAG повторов в гене *HTT* и степенью нарушения структурной организации нейроноподобных клеток – помимо дефектов цитоплазматических органелл при росте числа повторов возникают нарушения и в структурах, отвечающих за передачу нервного импульса – шипиков и синапсов.

Доказано, что ингибитор депо-зависимых кальциевых каналов EVR4593 снижает количество дефектных митохондрий и аутолизосом в цитоплазме нейроноподобных клеток с увеличенным числом CAG повторов, полученных из клеток пациентов с болезнью Хантингтона.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что впервые изучены особенности структуры клеток человека с увеличенным числом CAG повторов в гене *HTT* – пациент-специфических, содержащих 42-47 CAG повтора, и генетически модифицированных, содержащих 69 и 100-150 повторов, которые свидетельствуют о наличии спектра универсальных нарушений, связанных с ультраструктурной организацией таких органелл, как ЭПР, митохондрии и аутолизосомы.

Показано, что увеличение числа CAG повторов в гене *HTT* до 69 приводит в нейрноподобных клетках также к множественным дефектам в организации дендритов, шипиков и синапсов, и появлению гибнущих клеток. **Показано**, что увеличение числа CAG повторов до 100-150 приводит к возникновению в цитоплазме генетически модифицированных клеток НЕК293 четырехслойных мембранных структур, сформировавшихся в результате слипания двух цистерн шероховатого ЭПР.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что впервые получены доказательства негативного влияния увеличения CAG повторов в гене *HTT*, характерного для пациентов с болезнью Хантингтона, на ультраструктуру цитоплазматических органелл – шероховатого и гладкого ЭПР, митохондрий и аутолизосом.

Представлены доказательства, что ингибирование кальциевых каналов с использованием EVP4593 приводит к улучшению морфологии митохондрий и снижению числа дефектных аутолизосом в цитоплазме пациент-специфичных нейрноподобных клеток.

Результаты диссертационной работы имеют важное значение для понимания механизмов развития болезни Хантингтона и представляют интерес для научно-исследовательских организаций биологического и медицинского направления, связанных с изучением наследственных патологий человека нейродегенеративного генеза и поиском подходов для замедления их развития, а также в образовательном процессе при подготовке специалистов в области клеточной биологии, медицинской генетики и регенеративной медицины.

Применительно к проблематике диссертации результативно использованы современные методы просвечивающей электронной микроскопии, выполненные на высоком методическом уровне, а также методы морфометрического анализа параметров цитоплазматических органелл, применение которых значительно расширило и углубило существующие

представления о субклеточных дефектах при нейродегенерации по типу болезни Хантингтона.

Оценка достоверности результатов исследования показывает их высокую надежность, которая обеспечена соответствующим дизайном исследования, грамотным использованием современных клеточных подходов и просвечивающей электронной микроскопии в сочетании с морфометрическим анализом клеточных параметров. Оценка количественных параметров клеточных структур выполнена корректно и отражает современный подход к проведению статистического анализа.

Личный вклад автора заключается в планировании и проведении экспериментов, контроле качества полученных данных на всех этапах их анализа, обработке и интерпретации полученных результатов, апробации результатов исследования и подготовке публикаций. Основные научные результаты были получены автором самостоятельно. Клеточные линии, использованные в работе, предоставлены Некрасовым Е.Д. (Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова, Москва) и сотрудниками лаборатории эпигенетики развития (Институт цитологии генетики СО РАН, Новосибирск).

Полученные соискателем научные результаты соответствуют п.1 «Изучение строения клеток и тканей и общих закономерностей генеза, ультраструктурной организации и функции клеток эукариот, в том числе в составе тканей и органов» и п.2 «Клеточные компартменты и органеллы, их пространственная и структурнофункциональная организация. Цитоплазма, ядро, митохондрии, эндоплазматический ретикулум, комплекс Гольджи, эндосомы, лизосомы и лизосомоподобные органеллы, пероксисомы, хлоропласты и другие пластиды, плазматическая мембрана, клеточная оболочка. Рибосомы. Протеасомы. Немембранные органеллы и структуры, формируемые внутренне неупорядоченными белками и РНК» паспорта научной специальности 1.5.22. – клеточная биология (биологические науки).

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.

Диссертационный совет 1 ноября 2023 г. принял решение присудить Сульдиной Л.А. ученую степень кандидата биологических наук за решение научной задачи, связанной с изучением ультраструктурной организации нейроноподобных клеток, моделирующих развитие наследственных нейродегенеративных патологий по типу болезни Хантингтона.

В ходе защиты диссертации членами диссертационного совета критических замечаний высказано не было. Соискатель Сульдина Л.А. аргументированно ответила на все задаваемые ей в ходе заседания вопросы.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 18 человек, из них 6 докторов наук по специальности 1.5.22. – клеточная биология, участвовавших в заседании, из 27 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за – 17, против – 1, недействительных бюллетеней – нет.

Зам. председателя
диссертационного совета,
Академик РАН, д.б.н.



А.В. Кочетов

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

Т.М. Хлебодарова

01.11.2023 г