

ОТЗЫВ

члена диссертационного совета Пчелиной Софьи Николаевны на диссертацию Католиковой Наталии Викторовны на тему «Дифференцировка индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека в дофаминергические нейроны в условиях *in vitro*: изучение роли рецепторов, ассоциированных со следовыми аминами, и модуляции сигнального пути Notch», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.22. Клеточная биология

Актуальность темы исследования

Болезнь Паркинсона (БП) – распространенное нейродегенеративное заболевание. Нарастающая симптоматика (тремор, ригидность, брадикинезия) обусловлена в первую очередь селективной гибелью группы нейронов черной субстанции (ЧС) головного мозга. В настоящее время подходы к лечению заболевания направлены на симптоматическую коррекцию. Подходы фармакологической коррекции, направленные на замедление нейродегенерации отсутствуют. Нейропротекторных средств в настоящее время не существует. Одним из перспективных подходов к лечению заболевания является клеточная заместительная терапия, а именно введение в структуру мозга человека нейронов, продуцирующих дофамин, и восполняющих недостаточность дофамина в стриатуме. В настоящее время проводится ряд клинических исследований. Основным источником для получения клеток для трансплантации является дифференцировка плюрипотентных стволовых клеток человека в предшественники дофаминергических нейронов, проводимая *in vitro*. Несмотря на это актуальность оптимизации протоколов дифференцировки сохраняется. В этой связи задача исследования Католиковой Н. В., направленная на поиск факторов, влияющих на нейрогенез и эффективность получения дофаминергических нейронов (ДА-нейроны) из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) человека является крайне актуальной.

Научная новизна исследования

В работе оценен вклад рецепторов, ассоциированных со следовыми аминами, (TAARs) и ингибирования/активации сигнального пути Notch в процесс дифференцировки дофаминергических нейронов как на модели нокаутных мышей, так и на дофаминергических нейронах человека,

полученных из ИПСК методом направленной дифференцировки. Методами иммуногистохимии исследовано распределение TAAR2 и TAAR5. Впервые проанализирована динамика экспрессии всех шести рецепторов TAARs (TAAR1, TAAR2, TAAR5, TAAR6, TAAR8, TAAR9) на разных этапах дифференцировки ДА – нейронов. Так же впервые использован новый подход к активации сигнального пути Notch, имеющего важное значение в развитии центральной нервной системы в эмбриогенезе, а также в поддержании пула стволовых клеток, их пролиферации и дифференцировке.

Теоретическая и научно-практическая значимость исследования

Результаты диссертационного исследования Католиковой Н. В. существенно расширяют представления о факторах, влияющих на дифференцировку дофаминергических нейронов. Работа имеет важное прикладное значение. Выявленный фактор, влияющий на экспрессию генов развития дофаминергических нейронов на ранних этапах дифференцировки ИПСК (активация сигнального пути Notch путем экзогенной экспрессии), а также влияние нокаута генов TAAR5 и TAAR2 на число ДА-нейронов в ЧС мозга модельных мышей и на экспрессию нейротрофических факторов обозначают мишени для последующего влияния с целью обеспечения оптимизации протоколов дифференцировки ИПСК в дофаминергические нейроны, что повысит эффективность клеточной терапии БП.

Обоснованность и достоверность результатов исследования

Диссертационная работа Католиковой Н. В. выполнена на высоком методическом уровне. Высокая степень достоверности и обоснованности выводов, а также основных результатов диссертационной работы обусловлена разнообразием и адекватностью использованных подходов. Полученные выводы полностью соответствуют поставленной цели и задачам исследования.

Содержание диссертационной работы

Диссертация изложена доступным, научно выверенным языком, логично структурирована и легко читается. Что особенно хочется отметить, практически отсутствуют опечатки, или неточности формулировок.

Во введении автором обозначены актуальность, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы. Сформулированные автором задачи исследования адекватны и соответствуют поставленной цели.

В обзоре литературы достаточно подробно описана история развития клеточной терапии при БП. Автором проанализирован большой объем работ. Чувствуется насколько автор ориентируется в данной теме.

В главе «Материалы и методы исследования» описаны все экспериментальные методы исследования. Нужно отметить, что в настоящем исследовании использован широкий спектр современных молекулярно-биологических методов, таких как гистологические исследования, культивирование клеточных линий, получение дофаминергических нейронов из ИПСК человека, проточная цитометрия, высокоэффективная жидкостная хроматография, ПЦР в режиме реального времени и получение лентивирусных конструкций и др. В работе также широко использованы методы биоинформатического анализа. Особо хочется отметить полную характеристику полученных дофаминергических нейронов из ИПСК. Так в работе не только оценена экспрессия нейрональных маркеров, но также, что не всегда проводится, использован метод локальной фиксации потенциала (patch-clamp), который показал, что полученные нейроны способны спонтанно генерировать потенциалы действия с выраженными фазами деполяризации и реполяризации. В исследовании проведена дифференцировка 4х линий ИПСК человека, что является достаточным.

В главе «Результаты» приводится подробное описание полученных результатов. Данная глава подробно иллюстрирована. Хочется обратить внимание на то, что в работе были сопоставлены, например, два разных подхода при ингибировании сигнального пути Notch. Показано, что ингибирование на уровне регуляции активности транскрипционных факторов (нокдаун *RBPJ*) и на уровне отщепления внутриклеточного домена при помощи γ -секретазы (ингибитор γ -секретазы DAPT) имеет минимальные отличия. К основным результатам исследования можно отнести выяснение роли рецепторов TAARs, включающей оценку их экспрессии на разных этапах дифференцировки ИПСК в ДА-нейроны, а также оценку количества нейронов на нокаутных по генам *TAAR2* и *TAAR5*. Рецепторы следовых аминов были открыты сравнительно недавно, их роль в нейрогенезе остается неизученной, и работа Наталии Викторовны позволяет существенно продвинуться в этом вопросе. Так же важным представляется результат о влиянии активации сигнального пути Notch на экспрессию генов на различных этапах дифференцировки ИПСК.

В «Заключении» автор логично подводит итог всех исследований и резюмирует ключевые положения диссертационной работы.

Выводы диссертационного исследования соответствуют поставленным целям и задачам.

Сведения о полноте опубликованных научных результатов

По результатам диссертационного исследования опубликовано 6 статей и 1 обзор в журналах, индексируемых в базах данных Scopus и/или Web of Science, 1 глава в книге. Промежуточные результаты доложены на 7 отечественных и международных конференциях.

Вопросы и замечания

Замечаний к работе нет. Имеются вопросы:

Почему с целью активирования сигнального пути Notch был выбран подход, основанный на экзогенной экспрессии гена NICD?

Не планируется ли в дальнейшем оценить влияние на даунрегуляции рецепторов, ассоциированных со следовыми аминами TAAR2 и TAAR5 на паттерн экспрессии генов на разных стадиях развития ДА нейронов из ИПСК? Это представляется логичным и важным, поскольку в работе показано влияние нокаута данных генов на развитие ДА-нейронов на модельных животных.

Заключение

Диссертационная работа Католиковой Наталии Викторовны на тему: «Дифференцировка индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека в дофаминергические нейроны в условиях *in vitro*: изучение роли рецепторов, ассоциированных со следовыми аминами, и модуляции сигнального пути Notch» является законченной, самостоятельной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной задачи, имеющей важное значение для биологической науки в целом, а именно оценка роли рецепторов ассоциированных со следовыми аминами и модуляции сигнального пути Notch в дифференцировке дофаминергических нейронов, что определено будет способствовать оптимизации протоколов получения дофаминергических нейронов из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток. Диссертационная работа Католиковой Наталии Викторовны соответствует основным требованиям, установленным Приказом от 19.11.2021 № 11181/1 «О порядке присуждения ученых степеней в Санкт-Петербургском государственном университете», соискатель Католикова Наталия Викторовна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по научной специальности 1.5.22. Клеточная

биология. Нарушения пунктов 9 и 11 указанного Порядка в диссертации не установлены.

Член диссертационного совета

Д.б.н., заведующая лабораторией молекулярной генетики человека Федерального бюджетного учреждения «Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», г. Гатчина, Ленинградская область.

Подпись

Пчелина С. Н.

Дата

21.06.23

Подпись руки
ЗАВЕРЯЮ
НАЧАЛЬНИК ОТДЕЛА КАДРОВ ЗИНДЗЕВА А. Н.

Пчелиной С. Н.

