

В диссертационный совет 24.1.158.02 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины»

197376, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д.12.

ОТЗЫВ

на автореферат диссертационной работы Копытовой Алёны Эдуардовны «Оценка эффективности фармакологических шаперонов глюкоцереброзидазы на первичной культуре макрофагов пациентов с болезнью Гоше и GBA-ассоциированной болезнью Паркинсона», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. – Биохимия.

Работа направлена на углубление представлений о молекулярных механизмах болезни Гоше и болезни Паркинсона, а также на пользование этих знаний для разработки нейропротекторной терапии. В основе патогенеза обоих заболеваний лежит или может лежать изменение экспрессии гена *GBA1*, который кодирует фермент глюкоцереброзидазу (GCase), расщепляющий глюкозилцерамид или глюкозилсфингозин до глюкозы и соответственно до церамида или сфингозина. Мутации в данном гене приводят не только к развитию лизосомной болезни накопления – болезни Гоше, но также повышает в 20-30 раз риск развития болезни Паркинсона. Действительно, согласно Stoker с соавторами, 5% пациентов с болезнью Паркинсона являются носителями мутации в гене *GBA1* (Stoker TB, Torsney KM, Barker RA. Pathological Mechanisms and Clinical Aspects of GBA1 Mutation-Associated Parkinson's Disease. In: Stoker TB, Greenland JC, editors. Parkinson's Disease: Pathogenesis and Clinical Aspects. Brisbane (AU): Codon Publications; 2018 Dec 21. Chapter 3. DOI: 10.15586/codonpublications.parkinsonsdisease.2018.ch3).

В настоящее время для лечения болезни Паркинсона и болезни Гоше (2 и 3 типов, которые затрагивают нервную систему) практически не используют нейропротекторы, и малоэффективное лечение носит симптоматический характер. Как справедливо отмечает Копытова А.Э. в своем автореферате, в качестве нейропротекторов потенциально могут быть использованы

фармакологические шапероны, способствующие правильной сборке мутантных форм *GBA1* и транспортировке его к лизосомам. Разработка системы для скрининга на основе пациент-специфичных клеток, полученных от пациентов с болезнью Гоше и болезнью Паркинсона с мутацией в гене *GBA1*, а также оценка их эффективности в восстановлении функций глюкоцереброзидазы явились целью исследований диссертационной работы. В качестве шаперонов выбрано 4 вещества: амброксол, N07 и его модификации (N2 и N3), а в качестве объектов исследования (тестирования) макрофаги, полученные от пациентов двух нозологий, и дофаминергические нейроны, дифференцированные из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток - мононуклеаров периферической крови пациентов с болезнью Паркинсона с мутациями в гене *GBA1*.

В работе сформулированы 4 задачи, 3 из которых посвящены оценке эффективности выбранных шаперонов на модельных объектах. Однако не ясно, почему для культуры макрофагов, полученных от пациентов с болезнью Паркинсона, ассоциированной с мутацией *GBA1*, оценивались только активность глюкоцереброзидазы и концентрация субстратов, но не содержание фермента или его локализация, что было сделано с другими объектами исследования.

Раздел «Материалы и методы» подробно описывает процедуры для разработки системы скрининга, а также методы, которые использовались для оценки эффективности шаперонов в восстановлении работы фермента. При ознакомлении с этим разделом не совсем ясно, почему оценка выживаемости клеток при выборе концентрации шаперонов была осуществлена только при культивировании макрофагов, но не дофаминергических нейронов. Также в статистической обработке данных не указано, какой критерий использовался в случае нормального распределения значений в выборке, если таковые имелись.

В разделе «Результаты и обсуждение» охарактеризована система для скрининга эффективности шаперонов на основе клеток первичной культуры макрофагов пациентов с болезнью Гоше и болезнью Паркинсона, ассоциированной с мутациями в гене *GBA1*. Показана высокая эффективность амброксола, N2 и в несколько меньшей степени N07 по оцениваемым показателям. Согласно полученным результатам, активность фермента в значительной степени повышается после использования шаперонов, однако также показано увеличение содержания глюкоцереброзидазы в культуре макрофагов пациентов с болезнью Гоше и в дофаминергических нейронах,

дифференцированных из стволовых клеток пациентов болезни Паркинсона, ассоциированных с мутациями в *GBA1*. Крайне интересным представляется провести в будущем оценку специфической активности фермента (активность одной молекулы фермента), потому что, например, в культуре макрофагов, полученной от пациентов с болезнью Гоше, активность и содержание глюкоцереброзидазы увеличиваются соответственно в 1.2 и 1.5 раз после введения N07. Складывается впечатление, что шапероны влияют не столько на активность фермента, сколько на его содержание.

Хотелось бы также отразить интересный подход, примененный в работе, а именно оценка активности фермента и субстрата в двух кластерах пациентов с «легкой» и «тяжелой» мутациями. Согласно полученным данным, ответ макрофагов, полученных от двух кластеров пациентов, различается в зависимости от использованного шаперона, что, вероятно, свидетельствует о разных механизмах регуляции фермента в макрофагах в зависимости от «тяжести» мутации и различных механизмов действия выбранных шаперонов.

Сформированные комментарии и вопросы не умаляют достоинств данной работы –актуальности выбранной проблемы и полученных новых важных данных о молекулярных механизмах патогенеза болезни Гоше и болезни Паркинсона. Полученные оригинальные результаты открывают широкую перспективу для дальнейших исследований нейропротекторных свойств шаперонов (амброксол, N2 и N07) и их использования для лечения болезни Гоше и болезни Паркинсона, ассоциированных с мутациями в гене глюкоцереброзидазы.

Приведенные в автореферате выводы в полной мере соответствуют полученным результатам и логически следуют из них. Работа выполнена на высоком методическом уровне и, несомненно, имеет не только фундаментальное, но прикладное значение.

Апробация диссертации прошла на 17 российских и международных конференциях, было опубликовано 10 научных статей, 7 из которых в журналах перечня ВАК. Значительную часть экспериментальных результатов Копытова А.Э. получила самостоятельно.

Таким образом, ознакомившись с авторефератом, можно утверждать, что диссертационная работа Копытовой Алёны Эдуардовны «Оценка эффективности фармакологических шаперонов глюкоцереброзидазы на первичной культуре макрофагов пациентов с болезнью Гоше и GBA-ассоциированной болезнью Паркинсона» полностью удовлетворяет требованиям

к кандидатским диссертациям «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года №842 (в редакции с изменениями, утвержденными постановлением правительства Российской Федерации от 1 октября 2018 года №1168), а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. – «Биохимия».

Угрюмов Михаил Вениаминович



Заведующий лабораторией нервных и нейроэндокринных регуляций ИБР РАН; академик РАН, профессор, доктор биологических наук по специальности 1.5.5. Физиология человека и животных.

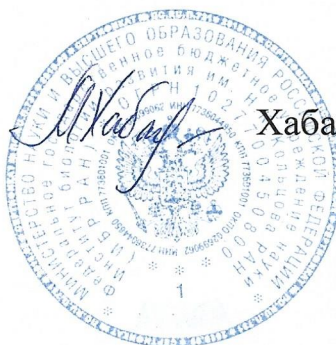
Место работы: Лабораторией нервных и нейроэндокринных регуляций ФГБУН Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН (ИБР РАН);

Адрес организации: 119334, г. Москва, ул. Вавилова, д. 26; Телефон: 8(499)135-88-42; Эл. почта: info@idbras.ru

Почтовый адрес Угрюмова М.В. 121170, г. Москва, пл. Победы, д. 2, кв. 23.

«Подпись Угрюмова М.В. заверяю»

Ученый секретарь ИБР РАН,



Хабарова Марина Юрьевна

« 08 » _____ сентября _____ 2023 г.