



МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
(МИНОБРНАУКИ РОССИИ)  
**Федеральное государственное  
бюджетное учреждение науки  
Институт эволюционной физиологии  
и биохимии им. И.М. Сеченова  
Российской академии наук  
(ИЭФБ РАН)**

пр. Тореза, д. 44, г. Санкт-Петербург, 194223  
тел.: 552-79-01, факс: 552-30-12  
e-mail: office@iephb.ru, http://www.iephb.ru  
ОКПО 02698559, ОГРН 1027801535728  
ИНН/КПП 7802038273/780201001

07.08.2023 № 1/491

На № \_\_\_\_\_

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального государственного  
бюджетного учреждения науки  
Института эволюционной физиологии и  
биохимии им. И.М. Сеченова  
Российской академии наук (ИЭФБ РАН)  
член-корр. РАН, д.б.н.  
**Михаил Леонидович Фирсов**



«07» августа 2023 г.

## ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук на диссертационную работу Копытовой Алены Эдуардовны на тему: «Оценка эффективности фармакологических шаперонов глюкоцереброзидазы на первичной культуре макрофагов пациентов с болезнью Гоше и GBA-ассоциированной болезнью Паркинсона», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. – Биохимия (биологические науки)

### Актуальность темы выполненной работы

Диссертационная работа Копытовой А.Э. посвящена разработке новых подходов для нейропротективной терапии болезни Гоше (БГ) и болезни Паркинсона (БП), а именно поиску новых фармакологических шаперонов



(ФШ) глюкоцереброзидазы (GCase) и оценке их эффективности в клетках первичной культуры макрофагов пациентов с БГ и GBA-ассоциированной БП (GBA-БП).

БГ – генетическое лизосомное заболевание, обусловленное дефектом фермента глюкоцереброзидазы (GCase), вследствие гомозиготных и компаунд-гетерозиготных мутаций в гене *GBA1*, кодирующем лизосомный фермент. Дисфункция GCase приводит к нарушению метаболизма лизосфинголипидов с их последующим избыточным накоплением в лизосомах клеток, в первую очередь в макрофагах ретикулоэндотелиальной системы, с развитием симптомов поражения селезенки, печени, костного мозга и, в 1-10% случаев, ЦНС. Терапия БГ в первую очередь направлена на восполнение ферментной недостаточности GCase и ингибирование биосинтеза глюкозилцерамида. Тем не менее обе стратегии неэффективны при нейропатических формах БГ. Следует отметить, что гетерозиготные мутации в *GBA1* являются наиболее частым известным генетическим фактором риска болезни Паркинсона (БП) (повышают риск развития БП в 6-8 раз) и играют ключевую роль в патогенезе БП. GBA - ассоциированная БП характеризуется снижением активности GBA и накоплением глюкозилсфингозина в плазме крови. БП – социально значимое, мультисистемное хроническое нейродегенеративное заболевание, которое характеризуется гибелью дофаминергических (ДА) нейронов черной субстанции головного мозга. БП до сих пор относится к числу неизлечимых. Неизлечимость БП прежде всего обусловлена поздней диагностикой и отсутствием патогенетически значимой терапии. Поэтому разработка новых технологий нейропротективной терапии БП и нейропатических форм БГ является одной из актуальных проблем клинической и фундаментальной медицины.

Общность патогенеза БГ и GBA-БП, связанных с дисфункцией *GBA1*, позволяет предполагать, что разрабатываемые таргетные препараты, направленные на повышение активности GBA, могут быть эффективны при



обеих нозологиях. В связи с этим тема диссертационной работы Копытовой Алены Эдуардовны «Оценка эффективности фармакологических шаперонов глюкоцереброзидазы на первичной культуре макрофагов пациентов с болезнью Гоше и GBA-ассоциированной болезнью Паркинсона» представляется крайне востребованной и актуальной как для проведения фундаментальных, так и прикладных научных исследований. Важно отметить, что для оценки эффективности фармакологических шаперонов, способствующих правильному фолдингу и транспорту GBA в лизосому, диссертант внес существенный вклад в разработку системы скрининга соединений и подходов для оценки их эффективности в восстановлении функции GCase с использованием пациент-специфичных клеток. Что является востребованным и актуальным при решении такого плана задач.

**Степень обоснования и достоверность научных положений,  
выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации**

Степень достоверности и обоснованности положений, выносимых на защиту, представленных в диссертации, обеспечена применением адекватных и современных биохимических, молекулярно-биологических методов, достаточным объемом исследованных выборок, а также корректной статистической обработкой полученных результатов исследований. Наглядность полученных результатов в виде рисунков, обстоятельное описание и анализ данных позволяют квалифицировать результаты диссертационной работы как достоверные, а основные положения, выносимые на защиту, выводы и практические рекомендации как вполне обоснованные. Представленные в диссертационной работе данные опубликованы в 10-и статьях и 5-ть из них в высокорейтинговых рецензируемых научных журналах с квартилем Q1, и доложены на конференциях, в том числе с международным участием, что также подтверждает достоверность и оригинальность полученных результатов.



## **Новизна полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации**

В рамках диссертационной работы Копытовой А.Э. разработана система скрининга соединений, направленных на восстановление функции GCase с использованием клеток первичной культуры макрофагов пациентов с мутациями в гене *GBA1* с оценкой активности и концентрации лизосфинголипида (гексозилсфингозин (HexSph)) методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС). Выбор клеток первичной культуры макрофагов в качестве подхода для изучения дисфункции GCase обусловлен тем, что макрофаги являются основным типом клеток, проявляющих фенотип заболеваний, связанных с дисфункцией GCase, благодаря высокому уровню экспрессии гена *GBA1*. Оригинальность подхода заключается в том, что активность фермента и накопление субстрата оценивается в сухом пятне клеток, нанесенных на фильтровальную бумагу методом ВЭЖХ-МС/МС, обладающим высокой чувствительностью.

В работе впервые показано, что первичная культура макрофагов отражает нарушения при дисфункции GCase наблюдаемые не только при БГ, но и при гетерозиготном носительстве мутаций в гене *GBA1* при GBA-БП.

В ходе исследования впервые показано, что фармакологический шаперон (ФШ) амброксол повышает ферментативную активность GCase и снижает концентрацию лизосфинголипидов в клетках первичной культуры макрофагов пациентов с GBA-БП.

Кроме того, впервые проведена оценка эффективности аллостерического активатора GCase - N07 в клетках первичной культуры макрофагов пациентов с БГ и GBA-БП (носителей гетерозиготных мутаций гена *GBA1*) и ДА нейронах, дифференцированных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК), пациента с GBA-БП. Показано, что ФШ N07 повышает активность GCase в культивируемых макрофагах пациентов с БГ, а также пациентов с GBA-БП, гетерозиготных носителей «легкой» мутации



N370S. При этом отмечается увеличение количества фермента GCase в клетках и повышается транслокация GCase в лизосому, что приводит к снижению концентрации лизосфинголипидов в культивируемых макрофагах пациентов с БГ. С использованием технологии репрограммирования ИПСК пациента с GBA-БП в ДА-нейроны было показано, что соединение N07 повышает активность и количество белка GCase в клетках.

Важной частью диссертационной работы Копытовой А.Э. является поиск химических модификаций известного ФШ N07 и оценка их влияния на восстановление функции GCase на пациент-специфичных клетках пациентов с БГ и GBA-БП. В рамках работы были предложены две модификации ФШ N07 - соединения N2 и N3. Показано, соединение N2 более эффективно, чем исходное соединение N07.

Данная работа, безусловно, значима для развития научных знаний о биологическом действии ФШ GCase. Полученные результаты позволяют предложить новый ФШ GCase, обладающий большей эффективностью в снижении концентрации субстрата – соединение N2.

### **Структура и содержание диссертационной работы**

Диссертационная работа имеет традиционную структуру: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение, заключение, выводы, список сокращений, список литературы и приложение. Текст диссертации приведен на 129 страницах, иллюстрирован 32 рисунками и 3 таблицами. Список литературы содержит 226 источников.

**Во введении** автор убедительно определяет актуальность темы исследования, формулирует цель и задачи диссертационной работы, обсуждает научную новизну полученных результатов, практическую значимость работы, приводит положения, выносимые на защиту, указывает личный вклад в проведенные исследования, степень достоверности результатов работы, апробацию результатов исследования, методологию и методы диссертационного исследования. Актуальность темы представленной работы, несомненна. Диссертационное исследование выполнено в



соответствии с современными тенденциями, отражающими концепцию изучения причин БГ, БП и изыскания путей их эффективного лечения.

**В литературном обзоре** подробно рассмотрены молекулярно-генетические, этиологические основы БГ и БП, в том числе GBA-ассоциированной БП, современные подходы для терапии БГ.

В заключительной части обсуждаются возможности использования пациент-специфичных клеток для поиска и оценки эффективности новых подходов для терапии БГ и GBA-БП с использованием ФШ GCase.

В разделе **«Материалы и методы»** подробно описаны методы исследования, задействованные в работе. В ходе работы были использованы современные генетические, биохимические и цитологические методы. Применялись такие методы, как получение клеток мононуклеарной фракции периферической крови с их последующим дифференцированием в макрофаги в присутствии колоние-стимулирующего фактора роста макрофагов, получение и культивирование ИПСК из мононуклеаров периферической крови, направленная дифференцировка ИПСК в ДА-нейроны, иммунофлуоресцентный анализ, проточная цитометрия, конфокальная микроскопия, оценка активности лизосомных ферментов и концентрации лизосфинголипидов методом ВЭЖХ-МС/МС, количественная оценка белка с помощью анализа вестерн-блот. Присутствует описание методов статистической обработки результатов.

Описание **результатов исследования** выполнено достаточно подробно. В нем выделяется три основных раздела: Активность GCase и концентрация HexSph в крови пациентов исследуемых групп; Создание *in vitro* модели для скрининга ФШ GCase в клетках первичной культуры макрофагов; Скрининг ФШ GCase в ДА-нейронах, дифференцированных из ИПСК. Этот раздел включает большое количество графиков с подробным описанием результатов полученных в ходе исследования.



Результаты, полученные автором с использованием современных методов, свидетельствуют о решении поставленных задач. Достоверность результатов и выводов диссертационной работы сомнений не вызвала.

В заключительной части диссертационной работы резюмированы результаты исследования и сформулированы выводы. К наиболее значимому результату следует отнести разработанность модели скрининга, поскольку данная модель может быть использована в дальнейшем для оценки эффективности других предложенных молекул, направленных на повышение активности глюкоцереброзидазы.

**Выводы** диссертации и основные положения, выносимые на защиту, адекватны поставленным задачам.

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

Результаты исследований Копытовой А.Э. могут быть использованы в дальнейшем поиске и оценки эффективности ФШ. В том числе и при других патологиях, связанных с нарушением конформации белка. Результаты работы могут быть использованы в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова», Федеральном государственном бюджетном научном учреждении "Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук" (Томский НИМЦ), Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (ИЦиГ СО РАН), Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт цитологии Российской академии науки, Федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

#### **Полнота изложения диссертации в опубликованных работах**



Результаты диссертационной работы в полной мере опубликованы в отечественных и зарубежных изданиях. По материалам диссертационного исследования было опубликовано 10 публикаций, в том числе 7 статей в изданиях из утвержденного Высшей аттестационной комиссией при Минобрнауки России перечня рецензируемых научных изданий, рекомендованных для публикации основных результатов диссертационных исследований для соискания ученой степени кандидата биологических наук.

### **Соответствие содержания диссертации автореферату и указанной специальности**

Автореферат в полной мере отражает содержание диссертационной работы, оформлен в соответствии с требованиями ВАК РФ и соответствует специальности 1.5.4. – Биохимия. Диссертация и автореферат написаны хорошим научным языком, легко читаются.

### **Замечания к работе**

Текст диссертационной работы содержит опечатки и пунктуационные ошибки, которые существенно не сказываются на восприятии текста и не влияют на научную ценность результатов. Принципиальных замечаний к диссертационной работе нет. Хотелось бы получить ответы на следующие вопросы в плане научной дискуссии:

1. Из текста диссертации не ясно как проводилась характеристика мутаций в гене *GBA1* в зависимости от их тяжести у пациентов с БГ и БП? Хотелось бы прояснить в плане обсуждения полученных данных о положительном эффекте ФШ N07 на активность GCase в культивируемых макрофагах пациентов с GBA-БП, гетерозиготных носителей «легкой» мутации N370S, но не у пациентов с GBA-БП, носителей «тяжелой» мутации L444P.
2. В диссертационной работе использованы химические модификации фармакологического шаперона N07 – соединения N2 и N3. На что направлены данные модификации?



3. Могут ли накапливающиеся при дисфункции GCase лизосфинголипиды влиять на агрегацию альфа-синуклеина и других белков в клетке? Является ли дефицит GCase специфичным для спорадической БП без мутаций в гене *GBA1*.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Копытовой Алены Эдуардовны на тему: «Оценка эффективности фармакологических шаперонов глюкоцереброзидазы на первичной культуре макрофагов пациентов с болезнью Гоше и GBA-ассоциированной болезнью Паркинсона», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. – Биохимия, выполненная под руководством доктора биологических наук Пчелиной Софьи Николаевны, является законченной научно-квалификационной работой, в которой сформулированы научные положения, совокупность которых можно квалифицировать как решение актуальной научной задачи, имеющей существенное значение в области биохимии.

Работа полностью соответствует требованиям п. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. №842 (в ред. Постановления Правительства от 11.09.2021 N 1539), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор – Копытова Алена Эдуардовна – заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. – Биохимия.

Диссертация, автореферат и настоящий отзыв обсуждены и одобрены на открытом заседании лабораторий сравнительной термофизиологии и молекулярной эндокринологии и нейробиологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук, протокол № 11 от 7 августа 2023 года.

Отзыв ведущей организации на диссертацию составлен заведующей лабораторией сравнительной термофизиологии Федерального

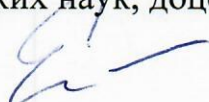


государственного бюджетного учреждения науки Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук, кандидатом биологических наук, доцентом Екимовой Ириной Васильевной и главным научным сотрудником лаборатории молекулярной эндокринологии и нейрехимии д.б.н., профессором Авровой Натальей Федоровной.

Заведующая лабораторией сравнительной термофизиологии, Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук

кандидат биологических наук, доцент

07.08. 2023 г.



Екимова Ирина Васильевна

тел. +7 (812) 552-30-24, e-mail: [irina-ekimova@mail.ru](mailto:irina-ekimova@mail.ru)

Главный научный сотрудник лаборатории молекулярной эндокринологии и нейрехимии, Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук

доктор биологических наук, профессор

07.08. 2023 г.



Аврова Наталия Федоровна

тел. +7 (812) 552-30-24, e-mail: [involved@mail.ru](mailto:involved@mail.ru)

Сведения о ведущей организации: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им.

И.М. Сеченова Российской академии наук

194223, Россия, г. Санкт-Петербург, проспект Тореза, д. 44

Телефон: (812) 552-79-01

Email: [office@iephb.ru](mailto:office@iephb.ru)

Сайт: [www.iephb.ru](http://www.iephb.ru)



И. В. Екимовой  
Н. Ф. Авровой  
С. П. Ауровской

07.08.2023