

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора биологических наук Малашичевой Анны Борисовны
на диссертационную работу Копытовой Алены Эдуардовны
«Оценка эффективности фармакологических шаперонов глюкоцереброзидазы
на первичной культуре макрофагов пациентов с болезнью Гоше
и GBA- ассоциированной болезнью Паркинсона»
представленную к защите в диссертационный совет 24.1.158.02
на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения
«Институт экспериментальной медицины»
на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 1.5.4 – «Биохимия»

Актуальность исследования

Диссертационная работа Алены Эдуардовны Копытовой посвящена разработке системы скрининга фармакологических шаперонов глюкоцереброзидазы и оценке их эффективности в восстановлении функций глюкоцереброзидазы с использованием клеток от пациентов с болезнью Гоше, либо с болезнью Паркинсона, ассоциированной с пониженной функцией глюкоцереброзидазы (GBA-ассоциированная болезнь Паркинсона).

Болезнь Гоше и болезнь Паркинсона – это нейродегенеративные заболевания, и существующие на сегодняшний день терапевтические подходы к этим заболеваниям обладают низкой эффективностью, и имеется высокая потребность в разработке альтернативных методов диагностики и лечения этих заболеваний, в частности на основе фармакологических шаперонов. Общность патогенеза заболеваний, связанных с дисфункцией глюкоцереброзидазы, а именно болезни Гоше и болезни Паркинсона, ассоциированной с мутациями в гене *GBA1*, кодирующем глюкоцереброзидазу, позволяет говорить о том, что разрабатываемые таргетные препараты, направленные на повышение активности глюкоцереброзидазы, могут быть эффективны при обеих нозологиях. Однако одной из существенных проблем, тормозящих развитие этого сегмента разработок, является дефицит релевантных клеточных моделей, на которых можно осуществлять тестирование лекарственных средств, эффективных в отношении активности глюкоцереброзидазы при болезни Гоше и болезни Паркинсона. В свете этого тема работы Алены Эдуардовны Копытовой представляется весьма актуальной и востребованной как с точки зрения фундаментальной науки, так и с точки зрения внедрения новых диагностических методов в клиническую практику.

С помощью современных и адекватных методов исследования диссертантом разработана система скрининга соединений, направленных на восстановление функции

глюкоцереброзидазы с использованием клеток первичной культуры макрофагов пациентов с мутациями в гене *GBA1* с оценкой активности и концентрации лизосфинголипидов (гексозилсфингозина) методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией. Проведенное диссертантом исследование создает необходимую инструментальную и методологическую базу для дальнейшей разработки систем скрининга и поиска соединений, которые в перспективе могут быть использованы для таргетной терапии при патологиях, ассоциированных с мутациями гена *GBA1*, что обуславливает высокую актуальность работы и её научную новизну.

Общая характеристика работы

Диссертационная работа состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение, заключение, выводы, список сокращений, список литературы (226 источников) и приложение. Работа изложена на 129 страницах машинописного текста, иллюстрирована 3 таблицами, 32 рисунками. По материалам диссертационного исследования было опубликовано 10 работ, 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, и 18 тезисов докладов.

В обзоре литературы подробно рассмотрены молекулярно-генетические, этиологические основы болезни Гоше и болезни Паркинсона, в том числе GBA-ассоциированной болезни Паркинсона, современные подходы для терапии болезни Гоше. Цитированные работы адекватно отображают современное состояние рассматриваемой проблемы. В заключительной части обзора литературы логичным образом обсуждаются возможности использования пациент-специфичных клеток для поиска и оценки эффективности новых подходов для терапии болезни Гоше и болезни Паркинсона, в том числе GBA-ассоциированной болезни Паркинсона с использованием фармакологических шаперонов глюкоцереброзидазы.

В главе, посвящённой описанию материалов и методов исследования, приведены подробнейшие протоколы проведения экспериментов и аналитических процедур: получение клеток мононуклеарной фракции периферической крови и их дальнейшая дифференцировка в макрофаги; получение допаминергических нейронов, дифференцированных из ИПСК; оценка активности глюкоцереброзидазы и концентрации гексозилсфингозина; колориметрическая оценка выживаемости клеток с помощью MTS теста на цитотоксичность; определение относительного уровня

глюкоцереброзидазы с помощью вестерн-блот анализа, оценка колокализации глюкоцереброзидазы и маркера лизосом LAMP2 в клетках первичной культуры макрофагов и в ДА-нейронах, дифференцированных из ИПСК, методом иммунофлуоресцентного окрашивания; оценка степени аутофагии в клетках первичной культуры макрофагов; статистическая обработка данных.

В третьей главе описываются полученные в диссертации результаты, в отдельном разделе обсуждается значение полученных данных и проводится критический анализ и их сравнение с имеющимися в литературе данными. Диссертантом разработан подход для оценки эффективности соединений, направленных на восстановление функции глюкоцереброзидазы в клетках первичной культуры макрофагов с оценкой активности глюкоцереброзидазы и концентрации лизосфинголипидов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией. Впервые показано, что клетки первичной культуры макрофагов периферической крови человека могут использоваться в качестве *in vitro* модели для изучения патогенеза заболеваний, связанных с дисфункцией глюкоцереброзидазы, а также оценки эффективности таргетной терапии не только для болезни Гоше, но и GBA-ассоциированной болезни Паркинсона. Проведена оценка эффективности амброксола, и аллостерических фармакологических шаперонов глюкоцереброзидазы. Обнаружен новый фармакологический шаперон, проявивший высокую эффективность в восстановлении функции глюкоцереброзидазы. Показано, что в допаминергических нейронах, дифференцированных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, полученных из мононуклеаров периферической крови пациента с GBA-болезнью Паркинсона, исследуемая модель *in vitro* может быть использована для оценки эффективности фармакологических шаперонов глюкоцереброзидазы при болезни Паркинсона. Проведенное исследование позволило предложить новый фармакологический шаперон, обладающий высокой степенью эффективности в снижении концентрации лизосфинголипидов. В заключительном разделе, автор делает заключение и приводит выводы, которые логично вытекают из результатов диссертации. Это позволяет признать выводы, а также положения, выносимые диссертантом на защиту, достоверными и обоснованными. Методические подходы, примененные в работе, являются адекватными поставленным задачам и достаточно современными. Все описанные в диссертации результаты опубликованы в рецензируемых изданиях и используют статистические критерии проверки. Результаты, приведенные в диссертационной работе, являются интересными и важными для проведения дальнейших фундаментальных и прикладных исследований.

В целом работа производит исключительно положительное впечатление. Работа очень аккуратно оформлена, логично написана ясным литературным языком. Изложение обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения не оставляет сомнений в высокой научной квалификации автора работы.

Вопросы и замечания

В работе изредка присутствуют опечатки, однако это не влияет на общее положительное восприятие изложенных результатов и достоверность выводов. У оппонента возникли следующие вопросы в ходе прочтения работы:

1. Полученные результаты показывают, что клетки первичной культуры макрофагов могут отражать изменения ферментативной активности глюкоцереброзидазы и концентрации гексозилсфингозина, наблюдаемые в крови пациентов и могут быть использованы для скрининга соединений, повышающих активность глюкоцереброзидазы, в том числе фармакологических шаперонов данного фермента. В то же время, при использовании допаминэргических нейронов от пациентов с ГВА-такой закономерности не наблюдали. С чем, по мнению автора, это может быть связано? Может ли это отражать то, что получаемые культуры нейронов имеют недостаточно высокий процент специфических нейронов? Или это может быть связано со спецификой конкретных пациентов или более комплексным патогенезом болезни Паркинсона?
2. Только ли допаминэргические нейроны при болезни ГВА-болезни Паркинсона затронуты дефицитом глюкоцереброзидазы? Не имеет ли смысл проверять также какие-то другие группы нейронов?
3. Насколько, по мнению, автора, реалистично применение находок диссертационной работы в клинической практике?

Заключение

Все вопросы по работе носят исключительно дискуссионный характер. Диссертационная работа Копытовой Алены Эдуардовны «Оценка эффективности фармакологических шаперонов глюкоцереброзидазы на первичной культуре макрофагов пациентов с болезнью Гоше и ГВА-ассоциированной болезнью Паркинсона» является законченной научно-квалификационной работой и соответствует критериям, установленным в пунктах 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации» от 24.09.2013 N 842 (ред. от 11.09.2021) на соискание ученой степени кандидата биологических наук по

специальности 1.5.4 – «Биохимия», а ее автор, Копытова Алена Эдуардовна, заслуживает присуждения искомой степени.

Официальный оппонент –


д.б.н, главный научный сотрудник,

заведующая лабораторией

Регенеративной биомедицины ФГБУН

«Институт Цитологии РАН»

e-mail: malashicheva@incras.ru

 Малашичева А. Б.

Федеральное государственное бюджетное

учреждение науки

«Институт цитологии

Российской академии наук»

194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий

проспект 4

Тел.: +7 (812) 297-18-29

e-mail: cellbio@incras.ru

Получено в канцелярии Малашичевой А.Б.
04.09.2023
канцелярией

