

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.158.02, СОЗДАННОГО
НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО
НАУЧНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ «ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ
МЕДИЦИНЫ», ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ
КАНДИДАТА БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 21 сентября 2023 г. № 127

О присуждении Копытовой Алене Эдуардовне, гражданину Российской Федерации, ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Оценка эффективности фармакологических шаперонов глюкоцереброзидазы на первичной культуре макрофагов пациентов с болезнью Гоше и GBA-ассоциированной болезнью Паркинсона»

по специальности 1.5.4. – Биохимия принята к защите диссертационным советом 24.1.158.02, созданным на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации по адресу: 197022, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д.12 (утвержден приказом Минобрнауки Российской Федерации №105/нк от 11.04.2012).

Соискатель Копытова Алена Эдуардовна 25.08.1994 года рождения. В 2018 г. окончила Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого», по направлению подготовки «Техническая физика», направленность «Медицинская физика» и получила квалификацию магистра. В период подготовки диссертации с 01.09.2018 по 31.08.2022 Копытова А.Э. обучалась в очной аспирантуре в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский

институт» по направлению подготовки 06.06.01 – «биологические науки», направленность 03.02.07 «Генетика» получив квалификацию «Исследователь. Преподаватель исследователь». С 2015 г. и по настоящее время работает в лаборатории молекулярной генетики человека Федерального государственного бюджетного учреждения «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» в должности младшего научного сотрудника.

Диссертация Копытовой Алены Эдуардовны выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт».

Научный руководитель – доктор биологических наук Пчелина Софья Николаевна.

Официальные оппоненты:

Журавлева Галина Анатольевна – доктор биологических наук, профессор кафедры генетики и биотехнологий Санкт-Петербургского государственного университета;

Малашичева Анна Борисовна – доктор биологических наук, заведующий лабораторией регенеративной биомедицины Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт цитологии Российской академии наук, дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук, в своем положительном отзыве, подписанном заведующей лабораторией сравнительной термофизиологией ФГБУН Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук, к.б.н. доцентом Екимовой Ириной Васильевной и главным научным сотрудником лаборатории молекулярной эндокринологии и

нейрохимии ФГБУН Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук, д.б.н. профессором Авровой Наталией Федоровной, утверждённом директором этого же учреждения Фирсовым Михаилом Леонидовичем 7 августа 2023 г., указала, что «тема диссертационной работы Копытовой Алены Эдуардовны... представляется крайне востребованной и актуальной как для проведения фундаментальных, так и прикладных научных исследований». «Актуальность темы... несомненна». «В ходе работы были использованы современные генетические, биохимические и цитологические методы». «Присутствует описание методов статистической обработки результатов». «Результаты, полученные автором с использованием современных методов, свидетельствуют о решении поставленных задач. Достоверность результатов и выводов диссертационной работы сомнений не вызвала». «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». «Результаты... могут быть использованы в дальнейшем поиске и оценки эффективности ФШ. В том числе и при других патологиях, связанных с нарушением конформации белка».

Соискатель имеет 10 опубликованных работ по теме диссертации, 7 из которых – статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ и, входящих в международные базы Scopus и Web of Science.

Наиболее значимые работы по теме диссертации:

1. Kopytova A. The pharmacological chaperone NCGC00241607 binds to allosteric sites of mutant β -glucocerebrosidase and improves its activity in human cells / A. Kopytova, G. Rychkov, A. Cheblokov, E. Grigor'eva, M. Nikolaev, E. Yarkova, D. Sorogina, F. Ibatullin, G. Baydakova, A. Izymchenko, D. Bogdanova, V. Boitsov, I.

- Miliukhina, V. Bezrukikh, G. Salogub, E. Zakharova, S. Pchelina, A. Emelyanov // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – Vol. 24. – №10. – 9105. Вид работы: статья в журнале. Объем публикации: 17 страниц. Вклад соискателя: проведено планирование эксперимента, работа по получению и культивированию макрофагов, оценка влияния фармакологического шаперона на активность и количество глюкоцереброзидазы, степень транслокации в лизосомы в клетках первичной культуры макрофагов и дофаминергических нейронах пациентов исследуемых групп, статистический анализ данных, подготовка публикации. Авторский вклад составил 70 %.
2. Kopytova A.E. Could blood hexosylsphingosine be a marker for Parkinson's disease linked with GBA1 mutations? / A.E. Kopytova, T.S. Usenko, G.V. Baydakova, M.A. Nikolaev, K.A. Senkevich, A.D. Izymchenko, A.A. Tyurin, I.V. Miliukhina, A.K. Emelyanov, E.Y. Zakharova, S.N. Pchelina // *Movement Disorders*. – 2022. – Vol. 37. – № 8. – P. 1779-1781. Вид работы: статья в журнале. Объем публикации: 3 страницы. Вклад соискателя: проведено планирование эксперимента, оценка активности фермента глюкоцереброзидазы и концентрации субстрата в крови пациентов исследуемых групп, статистический анализ данных, подготовка публикации. Авторский вклад составил 80 %.
3. Kopytova A.E. Ambroxol increases glucocerebrosidase (GCase) activity and restores GCase translocation in primary patient-derived macrophages in Gaucher disease and Parkinsonism / A.E. Kopytova, G.N. Rychkov, M.A. Nikolaev, G.V. Baydakova, A.A. Cheblokov, K.A. Senkevich, D.A. Bogdanova, O.I. Bolshakova, I.V. Miliukhina, V.A. Bezrukikh, G.N. Salogub, S.V. Sarantseva, T.C. Usenko, E.Y. Zakharova, A. K. Emelyanov and S.N. Pchelina // *Parkinsonism Relat Disord*. – 2021. – Vol. 10. – №84. – P. 112-121. Вид работы: статья в журнале. Объем публикации: 10 страниц. Вклад соискателя: проведено планирование эксперимента, работа по получению и культивированию макрофагов, оценка

влияния фармакологического шаперона амброксол на активность и количество глюкоцереброзидазы, степень транслокации в лизосомы в клетках первичной культуры макрофагов, полученных от пациентов исследуемых групп, статистический анализ данных, подготовка публикации. Авторский вклад составил 70 %.

4. Николаев М.А. Макрофаги периферической крови человека как модель изучения дисфункции глюкоцереброзидазы / М.А. Николаев, А.Э. Копытова, Г.В. Байдакова, А.К. Емельянов, Г.Н. Салогуб, К.А. Сенкевич, Т.С. Усенко, М.В. Горчакова, Ю.П. Ковальчук, О.А. Беркович, Е.Ю. Захарова, С.Н. Пчелина // Цитология. – 2018. – Т. 60. – № 12. – С. 1022-1028. Вид работы: статья в журнале. Объем публикации: 7 страниц. Вклад соискателя: проведено планирование эксперимента, работа по получению и культивированию макрофагов, оценка активности глюкоцереброзидазы и концентрации субстрата при различных условиях культивирования клеток, подбор оптимальных условий для проведения эксперимента, статистический анализ данных, подготовка публикации. Авторский вклад составил 50 %.

На диссертацию и автореферат поступили отзывы от:

1. профессора Угрюмова Михаила Вениаминовича - доктора биологических наук, академика РАН, заведующего лабораторией нервных и нейроэндокринных регуляций ФГБУН Института биологии развития им. Н.К. Кольцова Российской академии наук. Отзыв положительный, отмечается, что работа имеет не только фундаментальное, но и прикладное значение. В отзыве отмечается, что «Работа направлена на углубление представлений о молекулярных механизмах болезни Гоше и болезни Паркинсона, а также на пользование этих знаний для разработки нейропротекторной терапии. 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 мутациями в гене *GBA1*, оценивались только активность глюкоцереброзидазы и концентрация субстратов, но не содержание фермента или его локализация, что было проделано 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 было 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». Сформулированные 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».

2. профессора РАН Лебедева Игоря Николаевича – доктора биологических наук, заместителя директора по научной работе Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук, руководителя лаборатории онтогенетики Научно-исследовательского института медицинской генетики Томского НИМЦ. В отзыве отмечается, что «представленная на отзыв автореферат диссертации Копытовой Алены Эдуардовны является ярким примером приложения современных клеточных и биохимических технологий для разработки стратегий скрининга фармакологических шаперонов глюкоцереброзидазы (GCase) на их способность к эффективному компенсаторному восстановлению функции данного фермента у пациентов с болезнью Гоше и болезнью Паркинсона, носителей патогенетически значимых вариантов в гене *GBA1*».

3. профессора Салминой Аллы Борисовны – доктора медицинских наук, главного научного сотрудника и заведующей лабораторией нейробиологии и тканевой инженерии, заведующей отделом молекулярных и клеточных механизмов нейропластичности Института мозга федерального государственного бюджетного учреждения «Научный центр неврологии». Отзыв положительный, замечаний не содержит.
4. Костаревой Анны Александровны – доктора медицинских наук, директора Института молекулярной биологии и генетики ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова». В отзыве отмечается, что диссертационная работа актуальна, обладает научной новизной, практической и теоретической значимостью. В отзыве отмечается, что «Совокупность научных и прикладных результатов работы по исследуемой проблеме можно квалифицировать как новое решение задачи, имеющее существенное значение для персонализированного подхода в биологии и биохимии. Научная новизна работы определяется впервые проведенным в отечественной науке работами по созданию и сравнению нескольких клеточных линий в приложении к активности фермента глюкоцереброзидазы, а также концентрации его субстрата. Абсолютной научной новизной обладает раздел по изучению свойств и терапевтического потенциала модифицированного фармакологического шаперона N2».
5. Бучинской Натальи Валерьевны – кандидата медицинских наук, врача-генетика первой квалификационной категории консультативного отделения Санкт-Петербургского государственного казенного учреждения здравоохранения «Диагностический центр (медико-генетический)». Отзыв положительный, замечаний не содержит.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывался высоким уровнем их профессиональной компетенции, наличием публикаций в соответствующей сфере исследований.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

разработан подход к скринингу новых соединений, способных восстанавливать функцию мутантной формы фермента глюкоцереброзидазы, основанный на оценке активности глюкоцереброзидазы и концентрации гексозилсфингозина в первичной культуре макрофагов и дофаминергических нейронов, дифференцированных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток пациентов с мутациями в гене GBA1 (болезнью Гоше и болезнью Паркинсона);

предложен способ оценки эффективности фармакологических шаперонов глюкоцереброзидазы и проведено исследование действия нового аллостерического фармакологического шаперона на восстановление функции глюкоцереброзидазы;

доказано, что первичная культура макрофагов периферической крови человека может использоваться в качестве модели *in vitro* для изучения патогенеза заболеваний, связанных с дисфункцией глюкоцереброзидазы, а также оценки эффективности таргетной терапии при болезни Гоше и болезни Паркинсона, ассоциированной с мутациями в гене GBA1;

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

доказаны положения, расширяющие понимание биохимических процессов в патогенезе болезни Паркинсона, ассоциированной с мутациями в гене GBA1, и поиск подходов к таргетной терапии этого заболевания. Установлено достоверное снижение активности фермента глюкоцереброзидазы и повышение концентрации лизосфинголипидов как в периферической крови, так и в первичной культуре макрофагов пациентов с болезнью Паркинсона, ассоциированной с мутациями в гене GBA1. Изучена эффективность фармакологических шаперонов глюкоцереброзидазы при болезни Паркинсона,

ассоциированной с мутациями в гене GBA1 с использованием первичной культуры макрофагов и дофаминергических нейронов, дифференцированных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток пациентов,;

применительно к проблематике диссертации результативно использованы современные биохимические, молекулярно-генетические, цитологические и иммунохимические методы, а также статистический анализ;

изложены преимущества и недостатки использования различных клеточных культур, а также оценка потенциала их экспериментального использования в качестве модели *in vitro* при патологиях, связанных с дисфункцией лизосомного фермента глюкоцереброзидазы;

раскрыты данные по оценке эффективности различных типов фармакологических шаперонов глюкоцереброзидазы (соединений, проявляющих свойства рН-зависимого ингибитора смешанного типа и аллостерических шаперонов, имеющих сайты связывания на поверхности фермента глюкоцереброзидазы) и показана перспективность нового соединения, обладающего большей эффективностью в снижении концентрации субстрата (гексозилсфингозина) и повышении транслокации глюкоцереброзидазы в лизосомы;

выявлено, что эффективность фармакологических шаперонов глюкоцереброзидазы, продемонстрированная в культивируемых макрофагах пациентов с болезнью Гоше и болезнью Паркинсона, ассоциированной с мутациями в гене GBA1, зависит от типа мутаций в гене GBA1.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что они расширяют перечень потенциальных соединений для фармакотерапии болезни Гоше и болезни Паркинсона и являются предпосылкой для более детального изучения свойств и механизмов действия аллостерических фармакологических шаперонов глюкоцереброзидазы.

Оценка достоверности результатов исследования подтверждается:

достоверность полученных результатов обеспечивается достаточным количеством выполненных экспериментов с использованием широкого спектра современных методов исследования, а также корректной статистической обработкой;

теория и идеи базируются на сведениях, полученных в результате тщательного анализа современной отечественной и зарубежной научной литературы, посвященной молекулярным механизмам развития патологий, связанных с мутациями в гене GBA1, поиску адекватных клеточных моделей для оценки биохимических процессов, происходящих при этой патологии, описанию существующих на сегодня фармакологических шаперонов глюкоцереброзаидазы и изучению механизма их действия;

использовано сравнение авторских данных и данных, полученных ранее отечественными и зарубежными научными коллективами по изучаемой тематике, а именно по поиску и оценке эффективности соединений в качестве потенциальных фармакологических шаперонов глюкоцереброзаидазы;

установлено качественное совпадение авторских результатов с данными независимых исследований, в тех случаях, когда такое сравнение является обоснованным;

использованы современные биохимические, молекулярно-генетические, цитологические и иммунохимические методы исследования, а также высокоочищенные соединения, применяемые в качестве фармакологических шаперонов глюкоцереброзаидазы.

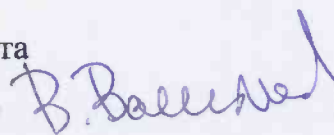
Личный вклад соискателя состоит в непосредственном участии в проведении всех основных этапов диссертационного исследования: планировании экспериментов, разработке оптимальных методических подходов, выполнении экспериментальной части работы, статистической обработке полученных данных и их интерпретации, обосновании выводов, подготовке

основных публикаций по теме диссертационной работы, а также апробации результатов на конференциях.

На заседании 21.09.2023 диссертационный совет принял решение: за создание нового подхода тестирования соединений, восстанавливающих функцию мутантной формы фермента глюкоцереброзидазы, с использованием пациент-специфичных клеток, полученных от пациентов с болезнью Гоше и болезнью Паркинсона, ассоциированной с мутациями в гене GBA1, и за разработку нового фармакологического шаперона глюкоцереброзидазы с большей эффективностью по сравнению с исходным соединением (N2) в снижении концентрации субстрата (гексозилсфингозина) и повышении степени транслокации глюкоцереброзидазы в лизосомы *in vitro* на пациент-специфичных клетках присудить Копытовой Алене Эдуардовне степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 25 человек, из них 7 докторов наук по специальности 1.5.4. – Биохимия (биологические науки), участвовавших в заседании, из 35 человек, входящих в состав совета, проголосовали: «за» - 24, «против» - 0, «недействительных бюллетеней» - 1.

Председатель диссертационного совета
доктор медицинских наук, профессор



Васильев В.Б.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат медицинских наук



Мухин В. Н