

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу **Юнусовой Анастасии Маратовны**
«НАСЛЕДОВАНИЕ СПОСОБНОСТИ ФИБРОБЛАСТОВ К
РЕПРОГРАММИРОВАНИЮ В ИНДУЦИРОВАННЫЕ
ПЛЮРИПОТЕНТНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ», представленную на
соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности
03.03.04 – «клеточная биология, цитология, гистология»

Актуальность исследования. Репрограммирование генома дифференцированных соматических клеток в плюрипотентное состояние является на сегодня одним из активно развивающихся направлений современной клеточной биологии. Это связано, прежде всего, с нашим пониманием процессов клеточной дифференцировки во время эмбриогенеза, закономерностей активации/инактивации экспрессии генов, а также механизмов формирования низкодифференцированного состояния клетки, в том числе трансформированных клеток. Несмотря на достигнутый прогресс в получении плюрипотентных стволовых клеток с помощью репрограммирования генома, многие вопросы, связанные с пониманием клеточных механизмов таких событий, остаются до конца неисследованными. Поэтому поставленная в диссертационной работе Юнусовой Анастасии Маратовны цель изучить закономерности репрограммирования в популяции эмбриональных фибробластов мыши в индуцированные плюрипотентные стволовые клетки является актуальной и своевременно поставленной проблемой.

Научная новизна представленной диссертационной работы не вызывает сомнения, так как многие результаты были получены впервые. Так, впервые для изучения способности к репрограммированию различных субпопуляций клеток был использован метод ДНК-баркодирования, который позволяет маркировать и отслеживать большое число клеток. В данной диссертационной работе впервые с помощью метода ДНК-баркодирования была маркирована большая клеточная популяция (до 200 000 клеток). В работе также впервые разработана компьютерная модель, позволяющая на основе экспериментальных данных и с учетом параметров баркодирования, определить уровень наследования способности к репрограммированию.

Теоретическая и практическая значимость результатов диссертационного исследования. Результаты диссертационной работы Юнусовой А.М., показавшие различную способность популяции мышинных фибробластов к репрограммированию, безусловно, важны для фундаментальной науки. Выявление особенностей успешно репрограммирующихся клеток позволит понять молекулярные основы процессов репрограммирования. Кроме того, получаемые плюрипотентные стволовые клетки могут быть, действительно, уникальным объектом для исследования процессов клеточной дифференцировки и регуляции экспрессии генов в эмбриогенезе. Практическая значимость результатов заложена в использовании индивидуальных плюрипотентных стволовых клеток для тканезаместительной терапии заболеваний человека и тестирования новых лекарственных препаратов.

Степень достоверности и обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. Основные результаты по исследованию способностей популяции эмбриональных фибробластов мыши к репрограммированию в индуцированные плюрипотентные стволовые клетки получены лично автором. Достоверность полученных результатов не вызывает сомнения. Автором проведена адекватная обработка результатов с помощью компьютерного моделирования и статистического анализа. Все исследования проведены с привлечением современных экспериментальных методов клеточной и молекулярной биологии. Выводы и рекомендации диссертационной работы корректны и в полной мере отражают полученные результаты.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа Юнусовой А.М. изложена на 109 страницах, она содержит 16 рисунков, 2 таблицы и 7 приложений. Диссертационная работа включает введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение, выводы и список литературы.

Во введении автор обосновывает актуальность выбранного исследования, четко формулирует цель и задачи исследования, научную новизну, теоретическую и практическую значимость полученных результатов, положения, выносимые на защиту. Обзор литературы состоит из 4-х глав. Первая глава посвящена плюрипотентным стволовым клеткам и их получению через репрограммирование соматических клеток. Автор справедливо отмечает сложность таких процессов и

необходимость их дальнейшего изучения. Во второй главе рассматриваются основные этапы репрограммирования, говорится о масштабности эпигенетических событий в этих процессах. В третьей главе приведены новые данные об альтернативных путях репрограммирования в рамках проекта "Project Grandiose". Автор приводит развернутую таблицу (стр. 34-43) об энхансерах и ингибиторах плюропотентности, что является весьма важной информацией для специалистов, работающих в области изучения и получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток. Наконец, заключительная 4-я глава посвящена описанию моделей репрограммирования.

Материалы и методы проведенного исследования полностью соответствуют поставленной цели и решаемым задачам. В качестве модели в работе использованы эмбриональные фибробласты мыши (ЭФМ) линии OG2 (ген *Gfp* под контролем промотора *Oct4*). Для наработки вирусов использованы клетки эмбриональной почки человека Phoenix. Для выполнения поставленных задач Юнусова А.М. использовала набор современных молекулярно-биологических методов исследования и методов клеточной биологии. Все методы описаны достаточно детально и могут быть легко воспроизведены.

В главе «Результаты» представлены результаты собственных исследований, где последовательно приводятся этапы проведения экспериментов, на рис. 2 приведена детальная схема эксперимента. В итоге автором создана и охарактеризована библиотека ДНК-баркодированных лентивирусных векторов, что позволило эффективно маркировать клеточную популяцию, включающую до 200 000 клеток. Была также предложена компьютерная модель с учетом экспериментальных параметров, что позволило оценить вероятность синхронного репрограммирования родственных клеток. С помощью компьютерного моделирования показано, что уровень наследования способности к репрограммированию лежит в диапазоне 0-60% (с наиболее подходящим значением 10%). Автором также показано, что исключение из анализа соматических стволовых клеток не приводит к уменьшению частоты синхронного репрограммирования родственных клеток. С помощью компьютерного моделирования установлено, что клетки с высоким митотическим потенциалом, содержание которых в исходной популяции не велико, обладают большей

способностью к репрограммированию. Именно эти клетки рассматриваются как возможные кандидаты на роль «элитарных» клеток.

В главе «Обсуждение» проводится достаточно детальный и глубокий анализ полученных результатов в контексте сравнения с современными данными научной литературы. Автор заключает, что в популяции эмбриональных фибробластов мышцы есть клетки с предрасположенностью к репрограммированию, что выражается в синхронном репрограммировании их потомков.

В целом, считаю, что диссертационная работа выполнена на высоком научном и методическом уровнях, а автором получены новые оригинальные результаты об использовании ДНК-баркодирования для изучения способности соматических эукариотических клеток к репрограммированию.

Материалы диссертационного исследования доложены и обсуждены на пяти международных научных конференциях. По результатам диссертации опубликовано 2 статьи в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК, из них 1 статья в зарубежном журнале.

Выводы диссертации соответствуют цели, задачам и основным положениям. При прочтении диссертации у меня возникли некоторые вопросы, главным образом, дискуссионного характера:

1. Из работы не ясно, может ли неодинаковая способность субпопуляций мышечных фибробластов к репрограммированию быть связана с разными местами встройки лентивирусных конструкций с факторами репрограммирования?
2. На стр. 21 обзора литературы, где приводится характеристика ранних стадий репрограммирования, говорится о мезенхимально-эпителиальном переходе, как необходимом процессе для большинства исходных клеток. Не ясно, всегда ли это так, возможен ли эпителиально- мезенхимальный переход.
3. Хотелось бы знать мнение автора, на какое число клеточных делений сохраняется способность фибробластов к репрограммированию генома.

Приведенные выше вопросы носят, в основном, дискуссионный характер и не снижают моей высокой оценки выполненной работы.

Заключение. Диссертационная работа на тему «Наследование способности фибробластов к репрограммированию в индуцированные плюрипотентные стволовые клетки» соответствует критериям пп. 9-14 "Положения о порядке присуждения ученых степеней", утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 года № 842, и представляет собой завершенную научно-квалификационную работу, а ее автор Юнусова Анастасия Маратовна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – «клеточная биология, цитология, гистология».

Гуляева Людмила
Федоровна



Официальный оппонент

доктор биологических наук,
профессор, руководитель лаборатории
молекулярных механизмов
канцерогенеза Федерального
государственного бюджетного
научного учреждения «Научно-
исследовательский институт
молекулярной биологии и биофизики»
630117, Россия, г. Новосибирск,
ул. Тимакова, 2/12,
Тел. 8(383) 335-98-47
imbb@niimbb.ru
<http://niimbb.ru>

Подпись профессора Гуляевой Л.Ф.
заверяю:
Ученый секретарь К.О.Н.



Сафронова
Ольга Геннадьевна

04 октября 2017 г.