

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА
на диссертацию Юнусовой Анастасии Маратовны «НАСЛЕДОВАНИЕ
СПОСОБНОСТИ ФИБРОБЛАСТОВ К РЕПРОГРАММИРОВАНИЮ В
ИНДУЦИРОВАННЫЕ ПЛЮРИПОТЕНТНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ»,
представленную к защите на соискание ученой степени кандидата
биологических наук по специальности 03.03.04 – «клеточная биология,
цитология, гистология»

Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) интересны не только как модельный объект для изучения многообразных процессов дифференцировки и созревания клеток любой тканевой принадлежности, но и как перспективный терапевтический инструмент. Тем не менее, широкое применение ИПСК в медицине затруднено из-за слабо стандартизируемого способа их получения. Только небольшая доля соматических клеток в популяции способна преобразоваться в ИПСК, причины такого селективного перехода не ясны. Наиболее популярными моделями, объясняющими столь низкую эффективность процесса формирования ИПСК являются стохастическая и элитарная. Стохастическая модель полагает способность перехода в ИПСК абсолютно случайным событием, происходящим в любой клетке с равной невысокой вероятностью. Согласно же элитарной модели, среди исходных клеток часть заведомо больше предрасположена к репрограммированию.

Работа Анастасии Маратовны ставит своей задачей выяснить, какая же гипотеза образования ИПСК является верной. Актуальность этой темы крайне высока, так как глубокое понимание биологии ИПСК позволит решить проблему применения индуцированных стволовых клеток на практике.

Диссертация А.М.Юнусовой написана по традиционному плану, состоит из Введения (4 стр.) и 4х глав: Обзора литературы (36 стр.), Материалов и методов (12 стр.), Результатов (22 стр.), Обсуждения (5 стр), а также Выводов (1 стр.) и Списка литературы (19 стр., 249 ист.).

Во Введении кратко обосновывается актуальность темы, рассмотрены две модели образования ИПСК. Формулируются цели и задачи исследования, приводится научная новизна полученных результатов, их научно-практическая ценность, а также личный вклад автора, который не вызывает сомнения. Приведены справка об апробации работы и выходные данные 2-х публикаций по теме диссертации, входящих в рекомендованный список ВАК.

Замечаний у оппонента по данному разделу нет

Глава 1 - Обзор литературы - изложена на 36 стр. В ней сначала подробно рассмотрена биология плюрипотентных стволовых клеток, затем автор освещает вопрос перепрограммирования соматических клеток в стволовые при помощи экспрессии ряда транскрипционных факторов. Это естественным образом подводит изложение к вопросу о причинах дифференциальной способности соматических клеток к репрограммированию.

Знакомство с обзором литературы оставляет самое благоприятное впечатление, не вызывает сомнения глубокое знание соискателем существа проблемы и путей её решения.

Замечаний по данной главе диссертации А.М. Юнусовой у оппонента нет.

Глава 2 - Материалы и методы - занимает 12 страниц. Работа выполнена на высоком уровне, с использованием как самых современных, так и хорошо зарекомендовавших себя классических методов: клонирование ДНК, работа с лентивирусными векторами, получение баркодированных библиотек, трансдукция первичных клеток млекопитающих, сортировка клеток при помощи FACS, высокопроизводительное секвенирование и компьютерный анализ данных. Методы изложены подробно, позволяют воспроизвести экспериментальную часть работы.

Глава 3 - Результаты - сравнительно небольшая по объему (22 стр), но очень информативная по содержанию и богато иллюстрирована многочисленными схемами, фотографиями и рисунками. Анастасия Маратовна воспользовалась методом баркодирования, то есть мечения уникальными ДНК-метками всех индивидуальных клеток в популяции, что в дальнейшем позволяет отслеживать судьбу потомков каждой из отдельных клеток. Помеченные клетки после удвоения были разделены на независимые субпопуляции. Далее, при помощи индуцируемого промотора была запущена экспрессия факторов Яманаки, что привело к началу репрограммирования клеток. После образования ИПСК Анастасия Маратовна сравнила были ли сдвиги в статистическом распределении в пользу не стохастического образования ИПСК. Пилотный эксперимент не позволил сделать однозначный вывод, однако указал на правильность выбранного подхода. Далее Анастасия Маратовна учла дополнительные факторы и поставила новые эксперименты. Для правильного дизайна экспериментов ей была разработана компьютерная модель, которая в дальнейшем облегчила интерпретацию полученных данных. Анастасия Маратовна обнаружила, что часть клеток передают способность к репрограммированию в ИПСК по наследству, свидетельствуя, таким образом, в пользу элитарной гипотезы.

Высоко оценивая научный вклад и методический уровень проведенного исследования, хотелось бы отметить, что все эксперименты, проведенные Анастасией Маратовной были выполнены на фибробластах мыши, что не позволяет обобщать результаты полученных ею данных на биологию всех ИПСК в целом, и на механизмы генеза ИПСК человека в частности. Однако это никак не снижает ценность работы, тем более, что этот вопрос затрагивается самой Анастасией Маратовной в обсуждении.

Результаты диссертационной работы Юнусовой Анастасии Маратовны суммированы в 6 выводах, которые полностью и объективно отражают результаты проведенного исследования. Материалы диссертации неоднократно докладывались на научных конференциях, представлены в 2 публикациях в журналах, входящих в список ВАК.

Содержание автореферата полностью соответствует основным положениям диссертации.

Научная новизна полученных результатов, их большая значимость очевидны.

В первую очередь, Анастасией Маратовной создана и охарактеризована библиотека ДНК-баркодированных лентивирусных векторов, позволяющая эффективно маркировать различные клетки. Далее ей была разработана компьютерная модель, для отладки параметров экспериментов и помощи в интерпретации экспериментальных данных. Даже исключив из анализа соматические стволовые клетки, частота синхронного репрограммирования родственных клеток выше ожидаемой для полностью стохастической модели. Анастасией Маратовной было впервые показано, что быстроделющиеся клетки при меньшем содержании в исходной популяции дают больший вклад в долю репрограммированных клеток, при этом они подходят на роль «элитарных» клеток, поскольку вероятность синхронного репрограммирования их потомков определяется не столько их количеством, сколько неизвестными, на сегодняшний день, внутренними факторами.

Относительно **практической значимости** следует отметить, что дальнейшее изучение механизмов образования ИПСК позволит в перспективе отбирать «элитарные» клетки-предшественники, значительно повышая выход ИПСК для прикладных нужд.

Заключение

Проведенное рецензирование свидетельствует, что по актуальности темы, новизне, объему, достоверности фактического материала, важности результатов, обоснованности сделанных в работе выводов и уровню публикаций рецензируемая работа «Наследование способности фибробластов к репрограммированию в индуцированные плюрипотентные стволовые клетки», удовлетворяет всем требованиям предъявляемым к кандидатским диссертациям (пункты 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842); квалификация ее автора, А.М. Юнусовой, несомненно, соответствует ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – «клеточная биология, цитология, гистология».

с.н.с. лаборатории иммуногенетики Федерального государственного бюджетное учреждения науки Института молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук (ИМКБ СО РАН)



Кулемзин Сергей Викторович



Почтовый адрес: г. Новосибирск, 630090, пр. ак. Лаврентьева 8/2.

Тел.: 363-90-72

e-mail: skulemzin@mcb.nsc.ru