

Федеральное агентство научных организаций

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ  
БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ  
ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК  
(ИНЦ РАН)**

194064 Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., 4  
тел. (812) 297-18-34, факс: (812) 297-35-41,  
эл.адрес: [cellbio@incras.ru](mailto:cellbio@incras.ru); <http://www.incras.ru/>

25.09.2017 № 12316-662-327

На № \_\_\_\_\_ от \_\_\_\_\_

УТВЕРЖДАЮ

Директор Федерального государственного  
бюджетного учреждения науки Института  
цитологии Российской Академии Наук  
доктор биологических наук



*[Signature]*  
С.О. Скарлато

**ОТЗЫВ**

ведущей организации Федерального государственного бюджетного учреждения науки  
Института цитологии Российской Академии Наук 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

Диссертация А. М. Юнусовой посвящена актуальной теме современной биологии и регенеративной медицины, связанной с изучением молекулярных механизмов и закономерностей репрограммирования соматических клеток в плюрипотентное состояние.

**Актуальность исследования.** Репрограммирование соматических клеток в плюрипотентные стволовые клетки (иПСК) под действием транскрипционных факторов, осуществленное 11 лет назад Шинией Яманака, явилось важной вехой в биологии, поскольку позволило создавать клеточные модели заболеваний человека, а также открыло возможности для использования плюрипотентных в регенеративной медицине. Несмотря на значительный



прогресс в понимании механизмов и закономерностей индуцированной плюрипотентности, некоторые важные вопросы остаются по-прежнему открытыми. Ответы на эти вопросы, помимо их практической пользы, приблизит нас к пониманию фундаментальных процессов дифференцировки и клеточной пластичности, имеющих место в природе. Так, до сегодняшнего дня нет единого мнения насчет существования внутри одного клона клеток, предрасположенных к репрограммированию в иПСК и о наследуемости этого признака дочерними клетками. Обе существующие модели, “стохастическая” и “элитарная”, имеют свое экспериментальное подтверждение.

Диссертация А. М. Юнусовой посвящена изучению данного вопроса, причем с помощью ранее не применявшегося для этих целей метода баркодирования с последующим математическим моделированием, и поэтому является весьма актуальной работой. Хочу подчеркнуть, что полученные сделанные данные важны с точки зрения понимания молекулярных основ клеточной пластичности, но также имеют и практическую ценность, о чем будет говориться ниже.

**Достоверность и обоснованность выводов и заключений.** А. М. Юнусовой получен большой объем экспериментальных данных, разработан математический аппарат для их интерпретации, на основе чего сделан абсолютно достоверный вывод об элитарном характере репрограммирования и о наследовании дочерними клетками предрасположенности к успешному репрограммированию в ходе по крайней мере одного клеточного деления. По теме диссертации опубликованы две статьи: одна – в ведущем российском журнале и другая – в престижном международном журнале. Результаты исследований обсуждались на всероссийских и международных научных конференциях и были представлены в тезисах пяти докладов.

**Научная новизна.** Рассматриваемая диссертация обладает несколькими признаками научно-методической новизны. Для изучения процесса репрограммирования при воздействии факторов Яманака впервые использован метод баркодирования, имеющий важное преимущество перед другими методами, поскольку позволяет одновременно отслеживать судьбу тысяч клеток. Была *de novo* разработана математическая модель, которая позволила сделать однозначные вводы в пользу элитарной модели репрограммирования и наследовании дочерними клетками способности к репрограммированию.

**Теоретическая и практическая значимость полученных автором результатов.** Полученные А. М. Юнусовой результаты важны как для понимания молекулярных механизмов и закономерностей репрограммирования соматических клеток в иПСК (искусственно создаваемого процесса), так и клеточной пластичности в ходе развития и во взрослом организме в гомеостазе и патологических процессах, как, например, развитии



атеросклеротических бляшек. Очень ощутима и практическая составляющая полученных результатов, причем не с точки зрения увеличения эффективности репрограммирования (существующая 0.1-1% эффективность более чем достаточна для получения 10-20 клонов иПСК, из которых один-два, наиболее удовлетворяющие критериям качества, пойдут на нужды пациента), а с точки зрения качества получаемых иПСК. Может оказаться, что как раз наиболее предрасположенные к репрограммированию элитарные клетки (по данным диссертанта и других исследователей таковыми являются быстро пролиферирующие клетки), как раз и дают начало линиям иПСК, отличающиеся генетической и эпигенетической нестабильностью, иммуногенностью, т. е. теми неприятными свойствами, которые хорошо задокументированы в недавней литературе и которые встают ощутимым барьером на пути внедрения этих клеток в клинику. Возможная связь предрасположенности к репрограммированию с качеством получаемых иПСК нуждается в тщательной экспериментальной проверке, и данные А. М. Юнусовой, несомненно, весьма полезны для таких исследований.

**Общая характеристика содержания диссертации.** Диссертация изложена на 110 страницах и содержит 17 рисунков и 3 таблицы. Дополнительная информация приведена в приложении, содержащем 6 рисунков и 1 таблицу. Список литературы содержит ссылки на 249 источника. Название диссертационной работы отражает тему и содержание исследования.

Во введении автор обосновал актуальность представленной научной проблемы, указал цели и сформулировал конкретные задачи исследования.

В обзоре литературы приведены сведения плюрипотентных стволовых клетках, о подходах для индукции этого состояния и характеризующих ее клеточных процессах. Подробно рассмотрены существующие модели репрограммирования. Следует отметить, что обзор литературы написан очень хорошо и, кроме того, достаточно полно отражает текущее состояние дел в области. Поэтому можно смело рекомендовать автору опубликовать ее в виде обзорной статьи.

Глава «Материалы и методы» написана подробно и доступно. Следует подчеркнуть, что работа выполнена на высоком методологическом уровне.

Раздел «Результаты» представляет собой логическое описание результатов, полученных автором в процессе работы. Интерпретация результатов проведена корректно с применением адекватных методов.

Выводы и заключения, сделанные в работе, соответствуют поставленной цели и задачам, и сделаны строго в соответствии с полученными результатами.

Содержание автореферата соответствует содержанию диссертации.



### **Замечания к работе.**

1. Фамилия Яманака не склоняется.
2. Стр. 17 и 20. “алугой”.
3. Стр. 18: «... повышенная экспрессия гена Oct4, как и гена Nanog, ключевых регуляторов плюрипотентности, приводит к дифференцировке ЭСК в клетки мезодермального ряда [Teo et al., 2011; Yu et al., 2011]». В первую очередь здесь следовало бы упомянуть до сих пор активно цитируемую статью Niwa et al. (Nature Genetics, 2000 24: 372-376), которая имеется в списке литературы.

Указанные замечания не снижают высокой научной ценности работы.

### **Вопросы:**

1. Анализ баркодов GFP+ клеток проводился на восьмые сутки после добавления Dox. Достаточно ли наличия экспрессии GFP (т.е. активации Oct4ΔPE-GFP трансгена), чтобы говорить о реальном репрограммировании в плюрипотентное состояние?
2. Предлагаемая Guo et al. (2014) элитарная модель предполагает, что привилегированными в плане способности к репрограммированию являются GMP клетки с чрезвычайно коротким клеточным циклом. Компьютерное моделирование, проведенное в диссертации, поддерживает эту гипотезу. Возникновение “ультрабыстрых” ЭФМ является ответом на экспрессию в них факторов Яманака. Тогда почему во вторичной системе репрограммирования с однородной Dox-индуцированной экспрессией этих факторов во всех ЭФМ частота возникновения иПСК по-прежнему далека от 100% (<4%)? Не противоречит ли последнее наблюдение предлагаемой модели?
3. Какие новые способы экспериментальной проверки этой модели вы бы предложили?

### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Диссертационная работа А. М. Юнусовой «Наследование способности фибробластов к репрограммированию в индуцированные плюрипотентные стволовые клетки» соответствует критериям п. 9 "Положения о присуждении степеней", утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор А. М. Юнусова, достойна присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология.

Отзыв на диссертацию и автореферат обсужден и одобрен на заседании Межлабораторного семинара Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института цитологии Российской Академии Наук (протокол № 5 от 22.09.2017 г.).

Заведующий Лабораторией молекулярной биологии стволовых клеток  
Федерального государственного бюджетного учреждения науки  
Института цитологии Российской Академии Наук  
Член-корреспондент РАН, профессор

Томилин Алексей Николаевич

25 сентября 2017 г.

Подпись руки *Томилин А.Н.*  
*25.09.2017*  
Заверяю  
Канцелярия  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт цитологии Российской Академии Наук