

ОТЗЫВ

на автореферат диссертации Живень Марии Константиновны на тему «Модуляция экспрессии HIF2 α в плюрипотентных стволовых клетках человека с использованием системы CRISPR/CAS9», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7 (генетика)

Диссертационная работа Живень М.К. представляет собой фундаментальную работу в области генетики и клеточной биологии, решающую важную задачу по исследованию роли гипоксических регуляторов транскрипции в контроле физиологических свойств эндотелия путем создания универсальной клеточной модели на основе генетически модифицированных эмбриональных стволовых клеток.

Особо следует отметить тот факт, что на основе разработанного подхода авторы видят перспективу создания нового класса клеточных продуктов для терапевтического ангиогенеза – интереснейшего направления регенеративной медицины, в котором в течение десятилетий имеется дефицит прорывных разработок методов клеточной терапии. Актуальность работы подкрепляется общепризнанной важностью гипоксических транскрипционных регуляторов семейства HIF, за открытие которых ранее была присуждена Нобелевская премия по физиологии и медицине.

Автором работы для создания модельной системы использован современный подход по генетической модификации эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) человека, в которых с помощью сайленсинга *EIF3E* удалось получить перманентную оверэкспрессию *HIF2A*, подавляя существующую обратную регуляторную связь этих двух генов. Полученные с помощью системы CRISPR/Cas9, в использовании которой у коллектива имеется мировой уровень экспертизы, клеточные линии прошли тщательную валидацию, также была показана не только оверэкспрессия *HIF2A*, но и ее влияние в нормоксических и гипоксических условиях в культурах полученных ЭСК с вытекающими эффектами на транскрипцию HIF-зависимых мишеней.

Помимо этого, в работе проведена и валидирована дифференцировка полученных клонов ЭСК с оверэкспрессией *HIF2A* в эндотелиоциты, ангиогенные свойства которых в дальнейшем были оценены в функциональном тесте *in vitro* с формированием трубочек на Матригеле. Следует сразу же отметить, что во всех описанных выше экспериментах автором работы использовались различные варианты моделирования парциального напряжения кислорода, в т.ч. с помощью хорошо известных способов т.н. «химической гипоксии» (внесение в культуру хлорида кобальта или DMOG). Автором также были установлены особенности хода мезодермальной и эндотелиальной дифференцировок полученных генетически модифицированных ЭСК. Так, было показано, что делеция *EIF3E*, вероятно, повышает эффективность дифференцировки в мезодермальном направлении, что нашло свое отражение в увеличении экспрессии маркерного гена *Brachyury*, что в дальнейшем хорошо коррелировало с повышением встречаемости в культуре клеток, несущих рецептор VEGFR2 характерный для эндотелиальных клеток.

В качестве потенциального ограничения работы может рассматриваться *in vitro* оценка ангиогенных свойств полученных эндотелиальных клеток. Однако этот вопрос с точки зрения разработки должен решаться на этапе доклинических исследований и отсутствие в данной работе релевантной животной модели не умаляет ее качества и важности.

Экспериментальные и статистические методы, использованные автором в работе, являются современными и вкупе с корректной интерпретацией позволили сделать логичные выводы, подкрепленные полученными данными. При обсуждении результатов в соответствующем разделе диссертации автором приведены данные других групп и исследователей и обсуждены некоторые важные находки. Так, например, подробное изучение метаболических паттернов адаптации полученных клеточных линий к сверхэкспрессии *HIF2A* установило, что генетически модифицированные ЭСК адаптировались путем совмещения гликолиза с митохондриальным окислением пирувата, т.е. по наиболее выгодному с точки зрения биоэнергетики клетки метаболическому пути.

Автореферат оформлен в соответствии с существующими требованиями к изложению основных и наиболее важных находок, хорошо проиллюстрирован и написан доступным литературным языком. Таким образом, диссертационная работа Живень М.К. содержит решение актуальной задачи биологии и медицины, выполнена в соответствии с существующими в этой области стандартами и требованиями. По результатам диссертации Живень М.К. в соавторстве опубликованы 3 статьи в научных журналах, входящих в перечень ВАК РФ (в т.ч. одна - в журнале Q1 WoS/Scopus), что полностью соответствует требованиям к кандидатской диссертационной работе. Результаты работы были представлены на российских научных конференциях с международным участием, автором также опубликованы 2 главы в коллективных монографиях.

Диссертация Живень М.К. на тему «Модуляция экспрессии HIF2a в плюрипотентных стволовых клетках человека с использованием системы CRISPR/CAS9» по своей актуальности, новизне, объему проведенных исследований является законченной научно-квалификационной работой, полностью соответствует требованиям «Положения о присуждении ученых степеней», предъявляемых к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает присуждения искомой ученой степени по специальности 1.5.7 – генетика.

Макаревич Павел Игоревич, к.м.н.

зав. лаб. генно-клеточной терапии
Института регенеративной медицины
Медицинского научно-образовательного центра
МГУ имени М.В. Ломоносова
Ломоносовский пр-т, 27, к.10.
119192, Москва
email: pmakarevich@mc.msu.ru
Тел/факс: +7 495 531 2777 (доб. 3156)

Подпись _____



«22» октября 2021 г.

Подпись Макаревич П.И. удостоверяю.
Начальник отдела кадров
МНОЦ МГУ имени М.В. Ломоносова



Пересторонина Н.Б.