

ОТЗЫВ

на автореферат диссертации Арссана Мхд Амина
«Регуляция эпигенетического статуса X-хромосом в культурах плюрипотентных стволовых
клеток человека»,
представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по
специальности 1.5.7. Генетика

Общая характеристика работы

Диссертационная работа Арссана Мхд Амина посвящена одной из ключевых проблем современной эпигенетики и биологии стволовых клеток – нестабильности эпигенетического статуса X-хромосом в культурах плюрипотентных стволовых клеток человека (ПСКч). Автор не ограничивается описанием нарушений инактивации X-хромосомы в наивных и праймированных ПСКч, а ищет условия культивирования, позволяющие целенаправленно управлять статусом X-хромосом: перезапускать инактивацию, исправлять её эрозию и воспроизводить в культуре случайный выбор инактивируемой X-хромосомы.

Диссертация изложена на 122 страницах, включает введение, четыре главы, выводы и список литературы из 202 источников, содержит 24 рисунка и 4 таблицы. Исследование выполнено на двух линиях эмбриональных стволовых клеток (HuES9, ESM04) и двух линиях индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (K6-4Lf, K7-4Lf) человека с использованием комплекса взаимодополняющих методов: РНК FISH, иммуноокрашивания интерфазных ядер и метафазных хромосом, анализа аллельной экспрессии методом пиросеквенирования, ОТ-ПЦР и проточной цитометрии. Основные результаты опубликованы в трёх статьях в рецензируемых научных журналах и представлены на пяти российских и международных конференциях. Автореферат написан ясным научным языком, хорошо иллюстрирован и полно отражает содержание исследования.

Актуальность темы исследования

Актуальность темы не вызывает сомнений. ПСКч широко используются для изучения раннего развития, моделирования заболеваний, скрининга лекарственных препаратов и разработки подходов клеточной терапии. Вместе с тем ни наивные, ни праймированные культуры не воспроизводят в полной мере инактивацию X-хромосомы: в праймированных линиях развивается эрозия инактивации с реактивацией X-сцепленных генов, а в наивных клетках неактивная X-хромосома реактивируется, но повторная инактивация при дифференцировке возможна лишь в некоторых протоколах и, как правило, оказывается неслучайной. Возникающая гетерогенность культур и дисбаланс дозы X-сцепленных генов сказываются на экспрессии онкогенов, метаболизме и созревании дифференцированных производных, что снижает воспроизводимость клеточных моделей и создаёт риски для применения ПСКч в регенеративной медицине. Поэтому поиск способов контролировать статус X-хромосом при культивировании ПСКч – задача и фундаментальная, и практически значимая.

Научная новизна и обоснованность полученных результатов

Научная новизна работы определяется следующими результатами.

Впервые показано, что ингибитор киназ SRC является ключевым компонентом среды HENSM для наивных ПСКч: наивные клетки, полученные без него, сохраняют реактивацию X-сцепленного гена HUWE1, но полностью утрачивают способность запускать инактивацию X-хромосомы при повторном праймировании.

Впервые установлено, что сочетание ингибитора SRC с LIF и FGF2 (среда iLF) позволяет исправлять эрозию инактивации непосредственно в праймированных индуцированных ПСКч, без их возврата в наивное состояние: к девятому пассажу обогащение H3K27me3 восстанавливается в 75–93 % клеток и восстанавливается экспрессия XIST. Показано, что коррекция идёт через промежуточное состояние с двумя сигналами H3K27me3 и преобладанием несплайсированных транскриптов XIST, напоминающее стадию демпфирования транскрипции X-хромосом в преимплантационном эмбрионе человека.

С помощью иммуноокрашивания метафазных хромосом на H3K4me2 показано, что в наивных ПСКч бывшая неактивная X-хромосома реактивируется лишь в отдельных районах и не восстанавливает паттерн активного хроматина, эквивалентный активной X-хромосоме. Эта эпигенетическая асимметрия обоснованно предложена автором как причина неслучайной инактивации при повторном праймировании.

На клонах линии HuES9 с эквивалентными и неэквивалентными X-хромосомами показано, что к случайной инактивации способны только клетки с эпигенетически эквивалентными X-хромосомами. Сравнение независимых клонов одной линии – методически изящное решение, позволяющее отделить эффект эпигенетической памяти от различий генетического фона.

Впервые продемонстрировано, что исключение ростовых факторов из среды HENSM обогащает культуру клетками, подобными тотипотентным (LEUTX-положительными), и что восстановление случайной инактивации X-хромосомы коррелирует с долей таких клеток. Отдельный интерес представляет охарактеризованная автором роль хемокина CCL2 как альтернативного LIF активатора каскада JAK/STAT3 в культурах ПСКч.

Достоверность результатов обеспечена использованием нескольких независимых линий эмбриональных и индуцированных ПСКч, сочетанием методов анализа на уровне транскрипции, хроматина интерфазных ядер и метафазных хромосом, количественной оценкой аллельной экспрессии по восьми X-сцепленным генам и статистической обработкой данных. Выводы логически вытекают из полученных результатов и полностью соответствуют поставленным задачам.

Теоретическая и практическая значимость

Теоретическая значимость работы состоит в выявлении сигнальных путей (SRC, LIF/JAK–STAT3, FGF2), управляющих инактивацией X-хромосомы в ПСКч человека, и в обосновании гипотезы о том, что компетентность к случайному выбору инактивируемой X-хромосомы формируется на стадиях, близких к зиготической активации генома. Практическая

значимость заключается в том, что полученные данные составляют методическую основу для разработки стандартизированных систем культивирования ПСКч со стабильным статусом Х-хромосом. Это важно для воспроизводимости моделей заболеваний, скрининга лекарственных препаратов и безопасности клеточных продуктов для регенеративной медицины.

Заключение

Диссертационная работа Арссана Мхд Амина «Регуляция эпигенетического статуса Х-хромосом в культурах плюрипотентных стволовых клеток человека» представляет собой завершённое самостоятельное научно-квалификационное исследование, в котором решена актуальная научная задача, имеющая важное значение для генетики, – выявлены компоненты культуральной среды и условия, позволяющие управлять эпигенетическим статусом Х-хромосом в плюрипотентных стволовых клетках человека. Работа соответствует специальности 1.5.7. Генетика. Автореферат в полной мере отражает содержание диссертации; основные результаты опубликованы в рецензируемых научных изданиях и прошли апробацию на российских и международных конференциях.

Диссертационная работа «Регуляция эпигенетического статуса Х-хромосом в культурах плюрипотентных стволовых клеток человека» соответствует основным квалификационным критериям (пункты 9–14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842 (в действующей редакции)), а ее автор, **Арссан Мхд Амин**, заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7. Генетика.

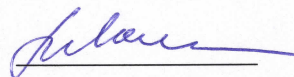
Доктор биологических наук (по специальности 1.5.22. Клеточная биология), главный научный сотрудник, заведующая лабораторией регенеративной биомедицины Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт цитологии Российской академии наук

194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий проспект, д. 4

Тел.: +7 (812) 297-18-29

E-mail: malashicheva@incras.ru

Малашичева Анна Борисовна



«12» октября 2026 г.

Согласна на включение моих персональных данных в аттестационное дело соискателя и на их обработку и размещение в информационно-телекоммуникационной сети «Интернет».

Подпись Малашичевой А.Б. заверяю:

Ученый секретарь Института цитологии РАН
к.б.н.



М.А. Бердиева