

«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор
Федерального государственного
бюджетного учреждения
«Федеральный научно-клинический
центр физико-химической
медицины имени академика
Ю. М. Лопухина Федерального
медико-биологического агентства»
Доктор биологических наук,
член-корреспондент РАН,
профессор
Мария Андреевна ЛАГАРЬКОВА



«09» октября 2026 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертационную работу Арссана Мхд Амина на тему: «Регуляция эпигенетического статуса X-хромосом в культурах плюрипотентных стволовых клеток человека», представленную к публичной защите в диссертационный совет 24.1.239.01 ИЦиГ СО РАН на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7. Генетика.

Актуальность и новизна исследования

Диссертационная работа М. А. Арссана посвящена актуальной проблеме фундаментальной и прикладной биологии – нестабильности статуса инактивации X-хромосомы в женских плюрипотентных стволовых клетках (ПСК) человека. Изучение этой проблемы имеет существенное значение как для понимания механизмов эпигенетической регуляции и дозовой компенсации генов X-хромосомы, так и для использования ПСК в моделировании заболеваний и регенеративной медицине.

Мышиные ПСК успешно использовались в качестве *in vitro* модели для исследования закономерностей инактивации X-хромосомы у мыши. Однако применение аналогичного подхода к ПСК человека существенно осложнено нестабильностью эпигенетического состояния инактивированной X-хромосомы при культивировании. Возникающие изменения могут сопровождаться частичной или полной утратой инактивации и нарушением дозовой компенсации X-сцепленных генов. Это способно изменять дифференцировочный потенциал ПСК, ограничивать достоверность моделирования при помощи ПСК X-

сцепленных заболеваний, а также затруднять практическое использование женских ПСК в качестве источника клеточного материала для регенеративной медицины. В связи с этим исследование механизмов поддержания и нарушения инактивации X-хромосомы, а также поиск условий, обеспечивающих стабильность её эпигенетического состояния, представляют собой важную и своевременную научную задачу.

Научная новизна работы М. А. Арссана заключается прежде всего в выявлении роли ингибирования SRC-киназ в восстановлении инактивации X-хромосомы в ПСК человека и разработке оригинального подхода к коррекции эрозии инактивированного состояния X-хромосомы, когда ПСК находятся в так называемом праймированном состоянии, эквивалентному постимплантационному эпибласту. Автор диссертации также всесторонне изучил, как репрограммирование праймированных ПСК человека в так называемое наивное состояние, соответствующее преимплантационному эпибласту, сказывается на инактивации X-хромосомы, и каким образом можно еще глубже сдвигать эпигенетический статус ПСК человека в сторону тотипотентного состояния. В частности, автором получены новые данные, что исключение ростовых факторов из среды культивирования наивных ПСК обогащает культуру клетками с признаками состояния, подобного тотипотентному, и сопровождается повышением степени случайности инактивации X-хромосомы при последующем переводе клеток в праймированное состояние.

Содержание диссертационной работы и ее завершенность

Диссертационная работа М. А. Арссана построена последовательно и имеет логически завершенную структуру. Она изложена на 122 страницах и включает введение, четыре главы, заключение, выводы и список литературы, содержащий 202 источника. Работа иллюстрирована 24 рисунками и четырьмя таблицами. Во введении автор убедительно обосновывает актуальность исследования, формулирует цель и задачи, характеризует научную новизну, теоретическую и практическую значимость полученных результатов, представляет два основных положения, выносимые на защиту.

Обзор литературы посвящен наивному и праймированному состояниям ПСК человека, сигнальным путям, участвующим в их поддержании, и механизмам регуляции инактивации X-хромосомы. Особое внимание М. А. Арссан уделяет гетерогенности эпигенетического статуса X-хромосомы, эрозии инактивации X-хромосомы и ограничениям существующих подходов к восстановлению инактивации X-хромосомы в ПСК человека. Обзор формирует необходимую основу для постановки задач исследования, а также служит отличным обобщением современного состояния данной научной проблемы.

В разделе «Материалы и методы» описаны использованные клеточные линии, условия их культивирования и дифференцировки, методы молекулярного и цитогенетического анализа. Большинство методик описаны подробно, с достаточным для воспроизведения экспериментов уровнем детализации. Вместе с тем описание методики пиросеквенирования недостаточно полно: не указано, какой из праймеров для амплификации был биотинилирован, и не приведены последовательности секвенирующих праймеров. Кроме того, отсутствует подробное описание получения препаратов метафазных хромосом методом цитоцентрифугирования для изучения распределения гистоновой модификации H3K4me2.

Глава «Результаты» содержит результаты собственных исследований. Автор последовательно рассматривает получение и характеристику наивных ПСК человека, изменения эпигенетического статуса X-хромосом при переходах между наивным и праймированным состояниями, роль ингибирования SRC-киназ в восстановлении инактивации и возможности коррекции её эрозии непосредственно в праймированных клетках. Отдельные разделы посвящены связи эпигенетической эквивалентности X-хромосом с характером их последующей инактивации, а также влиянию исключения ростовых факторов из среды на обогащение культуры клетками с признаками состояния, подобного тотипотентному, и на способность воспроизводить случайную инактивацию. В целом результаты описаны и проиллюстрированы в необходимом объёме. Исключением является раздел 3.8.1, где обсуждается количественная динамика доли клеток с фокусами H3K27me3 при последовательных пассажах в среде iLF, однако соответствующие числовые значения в этом разделе не приведены и отсутствует явная отсылка к данным, представленным ранее на рисунке 11. Это затрудняет сопоставление динамики накопления H3K27me3 с изменениями экспрессии XIST.

В главе «Обсуждение» полученные результаты сопоставлены с литературными данными, рассмотрены их возможные объяснения, ограничения и перспективы дальнейших исследований. Основные результаты обобщены в заключении и шести выводах, сформулированных корректно и взвешенно.

Содержание диссертации М. А. Арссана соответствует поставленной цели, а представленные результаты охватывают основные задачи исследования. Несмотря на отмеченные недостатки описания отдельных методик и представления данных, постановка проблемы, экспериментальная часть и обсуждение результатов образуют целостную

научную работу. Таким образом, диссертация М. А. Арссана представляет собой завершённое исследование в рамках поставленных цели и задач.

Теоретическая и научно-практическая значимость полученных результатов

Теоретическая значимость диссертационной работы М. А. Арссана заключается в расширении представлений о регуляции эпигенетического статуса X-хромосом в ПСК человека. Полученные результаты показывают, что транскрипционная реактивация ранее инактивированной X-хромосомы при переходе в наивное состояние не обязательно сопровождается устранением эпигенетических различий между двумя X-хромосомами. Выявленная связь этих различий с неслучайным характером последующей инактивации позволяет уточнить представления об эпигенетической памяти и пределах репрограммирования при переходах между состояниями плюрипотентности. Существенное значение имеют также данные о роли ингибирования SRC-киназ в обеспечении способности клеток возобновлять инактивацию X-хромосомы и о связи обогащения культуры клетками с признаками состояния, подобного тотипотентному, с повышением степени случайности последующей инактивации. Эти результаты формируют основу для дальнейшего изучения сигнальных и эпигенетических механизмов, вовлеченных в установление и поддержание статуса инактивации X-хромосомы.

Научно-практическая значимость работы определяется предложенными подходами к управлению эпигенетическим статусом X-хромосом посредством изменения условий культивирования ПСК человека. Особый интерес представляет возможность коррекции эрозии инактивации непосредственно в праймированных ПСК при совместном применении ингибитора SRC-киназ и цитокинов LIF и FGF2, без предварительного перевода ПСК в наивное состояние. Разработанные и исследованные культуральные условия могут служить основой для совершенствования методов получения и поддержания клеточных моделей на основе ПСК, используемых для изучения инактивации X-хромосомы, дозозависимых эффектов X-сцепленных генов и моделирования наследственных заболеваний. Полученные данные также обосновывают необходимость учитывать эпигенетическое состояние X-хромосом при оценке качества женских линий ПСК и интерпретации результатов их дифференцировки. Перспективы использования предложенных подходов при подготовке клеточного материала для регенеративной медицины связаны с дальнейшей проверкой полноты восстановления дозовой компенсации, долговременной устойчивости инактивации и сохранения восстановленного состояния в дифференцированных производных.

Степень достоверности результатов исследований, положений и заключения

Достоверность основных результатов диссертационной работы М. А. Арссана обеспечивается использованием взаимодополняющих методов молекулярного и цитогенетического анализа. Эпигенетический статус X-хромосом исследован посредством РНК-FISH, иммунофлуоресцентной детекции модификаций гистонов, анализа экспрессии генов методом ПЦР в реальном времени и оценки аллельного соотношения транскриптов X-сцепленных генов методом пиросеквенирования. Характеристика клеточных культур ПСК включала анализ маркеров плюрипотентности, оценку способности к дифференцировке и контроль кариотипа. Сопоставление данных, полученных разными методами, повышает обоснованность интерпретации наблюдаемых изменений статуса X-хромосомы.

Обоснованности основных положений способствуют использование нескольких линий эмбриональных и индуцированных ПСК человека, сопоставление различных условий культивирования, проведение экспериментов с исключением и добавлением отдельных компонентов культуральных сред, а также анализ изменений в ходе последовательных пассажей. В частности, роль ингибирования SRC-киназ в обеспечении способности наивных клеток возобновлять инактивацию X-хромосомы подтверждается как исключением ингибитора из среды HENSM, так и его добавлением в среду t2iLGö. Для оценки характера последующей инактивации использован анализ аллельной экспрессии восьми X-сцепленных генов, дополняющий цитологическую характеристику клеток. В работе предусмотрены биологические и технические повторности и применены методы статистической обработки данных.

Замечания

1. При оценке влияния культивирования в среде iLF на свойства ПСК автор ограничился анализом морфологии колоний и экспрессии маркеров недифференцированного состояния. Вместе с тем способность клеток после культивирования в этой среде дифференцироваться в производные трёх зародышевых листков не исследована. Поэтому приведённые данные подтверждают сохранение признаков недифференцированных ПСК, но недостаточны для заключения о сохранении их функциональной плюрипотентности. Такая проверка позволила бы более полно оценить влияние предложенных условий культивирования на свойства клеток и обосновать перспективы их практического использования.
2. В разделе 3.8.2, посвящённом влиянию хемокина CCL2 на свойства ПСК человека, отсутствуют ссылка на работу Hasegawa *et al.* (2014) и обсуждение её результатов (Hasegawa Y., Tang D., Takahashi N. *et al.* CCL2 enhances pluripotency of human induced pluripotent stem cells by activating hypoxia related genes // Scientific Reports. 2014. Vol. 4. Article 5228. DOI: 10.1038/srep05228). Между тем в этой работе ранее были продемонстрированы повышение экспрессии маркеров плюрипотентности, фосфорилирование STAT3 и активация генов гипоксического ответа под действием CCL2. Сопоставление полученных автором данных с результатами указанного исследования позволило бы точнее обозначить предшествующие научные предпосылки и новые результаты диссертационной работы, касающиеся уровней белков HIF1A/HIF2A, свойств эндотелиальных производных и возможностей коррекции эрозии инактивации X-хромосомы.
3. В тексте диссертации имеются редакционно-технические недочёты: опечатки («поддерживаься», «гипометилировнние», «преимплатнационных» и др.), дублирование заголовка в подписи к рисунку 7 и повторное введение ранее расшифрованных аббревиатур (например, ПСКч на страницах 5, 9, 43 и 92). Кроме того, требует уточнения описание хромосомного нарушения на рисунке 5: представленная на кариограмме делеция длинного плеча хромосомы 15 в тексте обозначена как делеция короткого плеча.

Вопросы

1. Какой смысл проведения теста на эписомы, проиллюстрированного на рисунке 3 фотографией геля с продуктами ПЦР, если автор взял в работу ранее охарактеризованные ИПСК, проверенные на интеграцию эписомных векторов, использованных для репрограммирования (Malakhova *et al.*, 2020)?
2. Каким образом автор определял пару X-хромосом на метафазных пластинках, приготовленных с помощью цитоцентрифугирования (Рисунок 7)?

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В заключение следует отметить, что диссертационная работа М. А. Арссана представляет собой завершённое исследование, посвящённое поиску подходов к регуляции эпигенетического статуса X-хромосом в ПСК человека. Её научную ценность определяют результаты, показывающие роль ингибирования SRC-киназ в обеспечении способности наивных ПСК возобновлять инактивацию X-хромосомы, а также возможность коррекции признаков эрозии инактивации непосредственно в праймированных ПСК. Работа тем самым объединяет исследование фундаментальных закономерностей эпигенетического репрограммирования ПСК с разработкой культуральных подходов, направленных на преодоление нестабильности инактивации X-хромосомы в ПСК.

Использование взаимодополняющих молекулярных и цитогенетических методов, сопоставление различных клеточных линий ПСК и условий культивирования позволили автору получить результаты, значимые для изучения дозовой компенсации и совершенствования клеточных моделей на основе женских ПСК человека. Высказанные замечания указывают на необходимость более полной функциональной характеристики ПСК, уточнения отдельных описаний и интерпретаций, а также устранения редакционно-технических недочётов, но не изменяют общей положительной оценки работы.

Опубликованные научные труды отражают содержание диссертационной работы; положения, выносимые на защиту, представлены в публикациях автора. Автореферат оформлен в соответствии с требованиями и отражает основное содержание диссертационной работы.

Таким образом, диссертационная работа Арссана Мхд Амина на тему «Регуляция эпигенетического статуса X-хромосом в культурах плюрипотентных стволовых клеток человека» полностью соответствует требованиям «Положения о присуждении ученых степеней» (утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а её автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7. Генетика.

Отзыв обсужден и одобрен на семинаре отдела клеточной биологии. Итоги голосования: «за» – единогласно (протокол № 6-26 от 16 сентября 2026 г.).

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю. М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю. М. Лопухина ФМБА России), 119435, г. Москва, ул. Малая Пироговская дом 1А, Телефон: +7 (499) 246-91-65, E-mail: e.kostryukova@niihfm.ru (Кострюкова Е. С.), director@rcpcm.ru (Лагарькова М. А.). <http://rcpcm.ru/>

Богомазова Александра Никитична,
заведующая лаборатории клеточной биологии,
к.б.н. по специальности «Радиобиология».

Подпись заверяю:



Кострюкова Елена Сергеевна, ученый секретарь ФГБУ ФНКЦ ФХМ им Ю. М. Лопухина ФМБА России, к.б.н.
9 октября 2026 г.