

ОТЗЫВ

Официального оппонента на диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических наук Галиакберовой Адели Альбертовны на тему: «Подходы к моделированию нейрогенеза *in vitro* при помощи индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека» по специальности 1.5.22 – Клеточная биология

Актуальность темы диссертационной работы

В настоящее время получение человеческих нейронов чрезвычайно актуально как для научных, так и для практических медицинских целей. Поскольку выделение первичных культур нейронов человека крайне затруднено, наиболее подходящим источником нейронов являются индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК). ИПСК характеризуются длительной способностью к самообновлению и потенциалом к дифференцировке в любой тип клеток трех зародышевых листков, именно поэтому данные клетки являются удобным источником для получения различных типов клеток, в том числе нейронов.

На сегодняшний день разработано большое количество протоколов нейральной дифференцировки ИПСК, в этой связи подробное изучение механизмов индукции дифференцировки, а также клеточного разнообразия получаемых культур нейронов представляется особенно актуальным. В диссертационной работе автор использовала два наиболее известных подхода дифференцировки ИПСК в нейроны. Первый подход – метод с двойным ингибированием SMAD сигналинга, приводит к дифференцировке ИПСК сперва в нейральные стволовые клетки (НСК), которые затем могут быть культивированы или направлены в терминальную дифференцировку в нейроны. Данный метод активно используется учеными во всем мире, поскольку отличается простотой исполнения, однако занимает достаточно длительное время. Второй подход основан на индукции нейральной дифференцировки при помощи экзогенной гиперэкспрессии в клетке гена транскрипционного фактора нейрогенина 2 (*NGN2*). В результате такого

подхода происходит прямая и быстрая дифференцировка ИПСК в нейроны, минуя стадию НСК.

Научная новизна, теоретическая и практическая значимость полученных результатов

Диссертационная работа Галиакберовой Адели Альбертовны, посвященная изучению двух подходов к дифференцировке ИПСК человека в нейроны, обладает не только теоретической, но и практической значимостью. В работе впервые было показано, что длительность культивирования НСК, полученных из ИПСК при помощи метода с DUAL SMAD ингибированием, влияет на общие транскриптомные профили и клеточное разнообразие в спонтанно дифференцированных из них нейральных культурах. Причем некоторые изменения в транскриптомных профилях схожи в нейральных культурах, полученных из разных линий ИПСК. Эти результаты показывают, что помимо того, что нейральные культуры, полученные при помощи метода с DUAL SMAD ингибированием, являются гетерогенными, на их состав существенно влияет длительность культивирования НСК. Полученные результаты представляют определенную значимость и должны быть учтены в дальнейшем исследователями при создании моделей нейрональной дифференцировки человека.

Впервые на модели с генетически кодируемым кальциевым индикатором GCaMP6s автором было показано, что культура нейронов, полученная при помощи индукции гиперэкспрессии *NGN2*, содержит нейрофизиологически активные клетки, в которых присутствуют активные ионотропные глутаматные NMDA и AMPA и/или каинатные рецепторы. Таким образом, *NGN2*-индуцированные нейроны, экспрессирующие кальциевый индикатор GCaMP6s, могут быть использованы в качестве модели для изучения влияния различных веществ на нейрофизиологическую кальциевую активность.

Также в представленной работе впервые проведено сравнение транскриптомных профилей нейральных культур, полученных с дифференцировкой нейральных культур через стадию НСК из ИПСК методом с DUAL SMAD ингибированием, а также подходом с экзогенной гиперэкспрессией *NGN2* на основе лентивирусной доставки трансгена в составе тетрациклин активируемой системы TetON.

Таким образом данные, полученные в данной работе, вносят вклад в понимание фундаментальных основ дифференцировки ИПСК в нейральном направлении, которые в дальнейшем будут полезны для разработки оптимальных нейральных моделей для различных научных и медицинских задач.

Степень обоснованности научных положений и выводов и достоверность полученных результатов

Представленная научная работа является четко спланированным исследованием и выполнена с использованием различных современных методов клеточной и молекулярной биологии, в том числе кальциевого имиджинга, методов иммуноцитохимического окрашивания, количественной ОТ-ПЦР, анализа транскриптомных данных и данных секвенирования РНК единичных клеток. Полученные результаты являются достоверными, а их статистическая обработка проведена с использованием адекватных методов.

Выводы в диссертационной работе обоснованы и соответствуют поставленным задачам и полученным результатам.

Результаты данной работы доложены на 2 конференциях. По материалам данной работы было автором было опубликовано 4 печатных работы, в том числе 1 обзорная статья, в рецензируемых журналах, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ им. М. В. Ломоносова.

Автореферат соответствует содержанию диссертации и отражает его ключевые разделы.

Оценка структуры и содержания диссертационной работы

Работа составлена по традиционному плану, и включает все необходимые разделы: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Публикации по теме работы» и «Список литературы». Помимо классических разделов данная работа имеет приложение. Текст диссертации состоит из 173 страниц, содержит 35 рисунков и 3 таблицы.

Материал изложен последовательно и понятно. Текст диссертации соответствует установленным правилам научного цитирования.

Глава «Обзор литературы» состоит из 4 разделов, в которых автор ссылается на зарубежные экспериментальные статьи и обзоры, опубликованные за последние 20-30 лет, в том числе на работы, опубликованные в 2023 году. Автор полностью владеет информацией о современном состоянии исследований в данной области. Автор приводит исчерпывающее описание нейрогенеза при эмбриональном развитии и во взрослом организме, а также уделяет значительное внимание особенностям различных подходов к дифференцировке ИПСК в нейроны, включая анализ характерных молекулярных механизмов. В целом, обзор литературы полностью отражает современное состояние проблемы.

Глава «Материалы и методы» содержит подробное описание методических подходов.

Глава «Результаты» состоит из 3 разделов. В первых двух разделах автор описывает результаты исследования при использовании каждого из двух подходов к дифференцировке ИИСК в нейроны, а в третьем – результаты сравнения транскриптомных профилей нейральных культур, полученных двумя подходами. Полученные результаты проиллюстрированы рисунками с

исчерпывающим описанием. Кроме того, дополнительные рисунки, а также таблицы с данными транскриптомов и секвенирования РНК единичных клеток, оформлены в отдельном приложении. В работе автором подробно проанализированы нейральные культуры, получаемые при помощи метода с DUAL SMAD ингибированием, и показана их гетерогенность с использованием транскриптомного анализа и соответствующих клеточных маркеров. Следует отметить, что нейральные культуры, полученные из разных линий ИПСК, имели существенные различия. Важным наблюдением является то, что длительность культивирования НСК влияет на транскриптомный профиль дифференцированных из них нейральных культур. Автором также был проведен анализ NGN2-индуцированных нейральных культур, полученных модифицированным протоколом. В частности, было проведено детальное исследование кальциевой активности при помощи генетически кодируемого кальциевого индикатора GCaMP6s. Наконец, было проведено сравнение транскриптомных профилей нейральных культур, полученных двумя разными подходами. Было показано, что нейральные культуры, получаемые при помощи метода с DUAL SMAD ингибированием, являются намного более гетерогенными, чем NGN2-индуцированные нейральные культуры. В частности, в NGN2-индуцированных нейральных культурах была отмечена значительная доля НСК и нейральных предшественников, а также были обнаружены клетки глиального дифферона. Примечательно, что протокол индукции дифференцировки на основе гиперэкспрессии *NGN2*, не позволяет получать некоторые типы нейронов, а именно, ГАМКергические нейроны.

В разделе «Обсуждение» приведено исчерпывающее обсуждение полученных результатов. Данный раздел свидетельствует об умении автора анализировать и интерпретировать результаты на основе актуальных данных научной литературы. Раздел «Заключение» резюмирует проведенные исследования. Приведенные выводы отражают основные результаты работы и являются исчерпывающими.

В целом, диссертационная работа Галиакберовой А.А. изложена грамотным языком, логична и последовательна. Диссертация соответствует специальности 1.5.22 – клеточная биология.

Замечания/комментарии/вопросы к представленной работе:

1. Во фразе «В нашем эксперименте мы направляли НСК в спонтанную дифференцировку, что позволило клеткам дифференцироваться в различном направлении: как в нейрональном, так в глиальном.» есть логическое противоречие. Если дифференцировка происходит спонтанно, автору следовало бы выбрать другую формулировку вместо утверждения, что НСК направляли в спонтанную дифференцировку, несмотря на то, что условия эксперимента подразумевали элиминацию факторов роста FGF2 и EGF из среды культивирования. Также возникает вопрос: «Что известно о механизмах действия FGF2 и EGF при дифференцировке НСК, и что происходит при их элиминации из среды культивирования?»

2. Формулировка «На 5-м, 10-м, 15-м, 20-м, 25-м (для KYOU и AFS17) и 30-м (только для KYOU) пассажах часть культур НСК были отправлены в спонтанную нейральную дифференцировку.» является стилистически неудачной.

3. Работа практически не содержит ошибок, за исключением всего нескольких, как например «Клетки типа С клетки подобны НППК в эмбриональном нейрогенезе и способны к нескольким симметричным делениям (Ponti et al., 2013).»

4. Также в работе встречается ряд стилистически неудачных формулировок, которые часто являются калькой с английского языка. Например, «Интересно, что iN-NGN2 демонстрировали не только кортикальную судьбу, но и судьбу периферических сенсорных нейронов.» Другим стилистически неудачным примером является фраза: «В процессе нормального развития мозга сигналы WNT через индукцию BMP-сигнализации постепенно исчезают, в результате чего нейрогенез сменяется глиогенезом, который, в свою очередь, становится более перекошенным в

сторону олигодендроцитов против астроцитов (Kasai et al., 2005; Gamez et al., 2013).»

5. В обзоре литературы подробно описаны роль эпендимальных клеток и астроцитов субгранулярной зоны зубчатой извилины гиппокампа взрослого головного мозга в регуляции дифференцировки НСК и поддержания состояния стволовости с участием Notch и его лигандов. Вопрос к автору: «Есть ли данные литературы о роли эндотелиальных клеток в регуляции поддержания стволовости в нише НСК в головном мозге и известны ли молекулярные механизмы этой регуляции?»

6. Существует два варианта написания: Матригель с маленькой и большой буквы. Чаше встречается написание с большой буквы как коммерческое название продукта. Чем руководствовался автор при выборе написания с маленькой буквы?

7. В работе приводится описание использования ROCKi (ROCK inhibitor) в разделе «Материалы и методы», однако нигде нет объяснения, для чего это было сделано.

8. Характерной особенностью данной работы является общее высокое качество иллюстраций. Однако, следует отметить, что на рисунках 10А, 13А, 17 и 18 следовало бы поставить стрелки, что облегчило бы понимания основной мысли автора при обсуждении особенностей морфологии анализируемых культур и присутствия в них конкретных клеток.

Заключение

Указанные выше замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация Галиакберовой Адели Альбертовны на тему «Подходы к моделированию нейрогенеза *in vitro* при помощи индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека» отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к диссертационным работам на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Содержание соответствует специальности 1.5.22 – Клеточная биология (по биологическим наукам), а

также критериям, определенным в пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова. Диссертационная работа оформлена согласно требованиям Положения по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Таким образом, соискатель Галиакберова Аделя Альбертовна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.22 – Клеточная биология.

Официальный оппонент:

Доктор биологических наук,
заведующая лабораторией морфогенеза
и репарации тканей ФГБОУ ВО «Московский
государственный университет имени
М. В. Ломоносова»
факультета фундаментальной медицины

Рубина Ксения Андреевна

20 августа 2024 года

Контактные данные:

тел.: +790372 1, e-mail: rk@...il.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация:

03.03.04 – «Клеточная биология, цитология, гистология»

Адрес места работы:

119991, г. Москва, ул. Ломоносовский пр-т., дом 27, корп. 1

ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М. В.
Ломоносова». Факультет фундаментальной медицины

Тел.: 8 (495) 00; e-mail: rk@...nail.ru



К.А. Рубиной
ЖЕВНОВА И. А.
Жевнова