

**ОТЗЫВ официального оппонента
на (о) диссертацию(и) на соискание ученой степени
кандидата биологических наук Арбатского Михаила Спартаковича
на тему: «Выяснение механизмов развития гетерогенного ответа
мезенхимных стромальных клеток на профибротические стимулы с
использованием анализа транскриптома единичных клеток»
по специальности 1.5.8 Математическая биология, биоинформатика**

Общая характеристика работы и актуальность исследования

Представленная к защите диссертация М.С. Арбатского посвящена актуальной проблеме современной биологии и биомедицины – выяснению молекулярных механизмов гетерогенного ответа мезенхимных стромальных клеток (МСК) на профибротические стимулы с применением передовых методов анализа транскриптома единичных клеток. Фиброз органов является одной из ведущих причин смертности во всем мире, при этом существующие терапевтические подходы остаются малоэффективными. Традиционные представления о том, что все МСК в профибротическом микроокружении единообразно дифференцируются в миофибробласты, не объясняют вариабельности клинических проявлений фиброза и различий в эффективности терапевтических вмешательств.

Актуальность исследования определяется несколькими факторами. Во-первых, несмотря на интенсивное изучение роли МСК в регенеративных процессах и развитии фиброза, механизмы, определяющие судьбу отдельных клеток в популяции при воздействии профибротических стимулов, остаются недостаточно изученными. Во-вторых, появление технологий секвенирования РНК единичных клеток (scRNA-seq) открыло принципиально новые возможности для изучения клеточной гетерогенности, которые до настоящего времени не были в полной мере применены к анализу ответа МСК на профибротическое микроокружение. В-третьих, идентификация субпопуляций МСК с различными функциональными свойствами может иметь важное практическое значение для разработки новых подходов к терапии фибротических заболеваний и персонализированной медицины.

Автор обоснованно применил современные методы биоинформатического анализа данных scRNA-seq, включая алгоритмы снижения размерности (PCA, UMAP), кластеризации (Louvain algorithm), интеграции данных, анализа траекторий развития клеток, RNA velocity, а также идентификации регуляторных сетей (SCENIC). Комплексное использование этих подходов позволило получить новые фундаментальные знания о механизмах формирования гетерогенного ответа МСК на профибротические стимулы.

Научная новизна и практическая значимость работы

Научная новизна диссертационного исследования не вызывает сомнений. Впервые с использованием методов одноклеточного транскриптомного анализа показано, что популяция МСК человека при культивировании в условиях профибротического микроокружения демонстрирует гетерогенный ответ с формированием дискретных субпопуляций, различающихся по экспрессии α -гладкомышечного актина (α -SMA) – ключевого маркера дифференцировки миофибробластов. Установлено, что только часть клеток характеризуется высоким уровнем экспрессии гена ACTA2, в то время как остальные клетки сохраняют низкий уровень экспрессии этого гена и демонстрируют принципиально иной транскриптомный профиль.

Детальная характеристика α -SMA-негативной субпопуляции выявила её уникальные функциональные особенности. Показано, что эта субпопуляция характеризуется повышенной экспрессией генов, связанных с деградацией внеклеточного матрикса (катепсин К, матриксные металлопротеиназы MMP1 и MMP3), что свидетельствует об их потенциальных антифибротических свойствах. Функциональный анализ выявил обогащение процессами организации внеклеточного матрикса, регуляции ангиогенеза, метаболизма липидов и дифференцировки клеток в остеогенном и хондрогенном направлениях.

Особый интерес представляет идентификация регуляторных молекул, потенциально вовлеченных в формирование антифибротического фенотипа МСК. Впервые показана дифференциальная экспрессия длинной некодирующей РНК LINC01705 в α -SMA-негативной субпопуляции. Проведенный автором биоинформатический анализ выявил, что эта днРНК взаимодействует с белком ZNF469, участвующим в синтезе волокон коллагена, и может регулировать экспрессию генов, связанных с фиброзом, через взаимодействие с микроРНК. Кроме того, идентифицирован набор микроРНК (hsa-mir-10a-5p, hsa-mir-34a-5p, hsa-mir-27a-3p, hsa-mir-194-5p, hsa-mir-18a-5p, hsa-mir-20a-5p, hsa-mir-451a, hsa-mir-129-5p, hsa-mir-29a-3p, hsa-mir-29b-3p, hsa-mir-29c-3p), потенциально участвующих в регуляции дифференцировки и функциональных свойств МСК.

Важным достижением работы является идентификация активных регулонов и транскрипционных факторов в различных субпопуляциях МСК с использованием алгоритма SCENIC. В антифибротической субпопуляции выявлена активность транскрипционных факторов TEAD3, ARID5B, TBX15 и MSC, контролирующих процессы дифференцировки клеток, отрицательной регуляции ответа на внешние стимулы и биосинтетических процессов. Для ТФ ARID5B показана регуляция процессов отрицательной регуляции ответа на внешние стимулы и биосинтетических процессов, что может объяснять механизм формирования устойчивости к профибротическим сигналам.

Практическая значимость работы определяется несколькими аспектами. Во-первых, идентифицированы мембранные маркеры (PDGFR α для α -SMA-негативной субпопуляции; LIMS2, CRIM1 и CDH2 для α -SMA-позитивной субпопуляции), которые могут быть использованы для разделения субпопуляций МСК методом клеточного сортирования. Это открывает возможности для получения обогащенных препаратов МСК с заданными функциональными свойствами для клеточной терапии. Во-вторых, предложен подход экспресс-анализа данных scRNA-seq биологических образцов пациентов для прогнозирования склонности к развитию фиброза, что может

найти применение в персонализированной медицине, особенно в эстетической челюстно-лицевой хирургии. В-третьих, выявленные регуляторные сети и сигнальные пути представляют собой потенциальные мишени для фармакологического воздействия с целью модуляции соотношения про- и антифибротических субпопуляций МСК.

Новизна и практическая значимость работы подтверждаются получением патента РФ №2766707 от 15.03.2022 г. «Средство для лечения фиброза тканей на основе компонентов секрета мезенхимных стромальных клеток, способ получения и применения средства».

Степень обоснованности положений, выносимых на защиту, научных выводов и рекомендаций

Положения, выносимые на защиту, в целом хорошо обоснованы экспериментальными данными и результатами биоинформатического анализа. Автор применил современные и адекватные поставленным задачам методы исследования. Использование технологии 10x Genomics для подготовки библиотек и высокопроизводительного секвенирования на платформах HiSeq1500 и NovaSeq 6000 обеспечило получение данных высокого качества с достаточной глубиной прочтений (20000 прочтений на клетку в первом повторе). Применение пайплайна Cell Ranger для первичной обработки данных, картирования на референсный геном (GRCh38) и транскриптом (Ensembl 93), а также фильтрации матриц экспрессии соответствует современным стандартам в области одноклеточной транскриптомики.

Особо следует отметить комплексный подход к типированию клеток, предложенный автором. В работе последовательно применены три метода: автоматическое типирование с использованием пакета SingleR и референсных баз данных (HPCA и Blueprint), типирование по специфическим маркерам с использованием баз данных PanglaoDB и CellMarker, и типирование по биологическим процессам с анализом обогащения генов терминами Gene

Ontology. Такой многоуровневый подход позволил преодолеть ограничения отдельных методов и получить более полную картину клеточной гетерогенности.

Использование методов RNA velocity и анализа траекторий развития (Slingshot, PAGA) для исследования динамики дифференцировки МСК является методологически оправданным и добавляет важное временное измерение к статическим данным scRNA-seq. Визуализация траекторий развития убедительно демонстрирует последовательность клеточных состояний и направления дифференцировки.

Замечания к диссертационной работе

Вместе с тем, следует отметить некоторые аспекты, требующие дополнительного обсуждения или уточнения:

1. Подписи к рисункам содержат не всю информацию. Например,

- рис. 23 содержит графики для 4 библиотек МСК, а в подписи дана расшифровка только для двух;
- рис. 24 содержит 8 графиков, расшифровка дана только для 4. Также непонятно, для какого из 2 пациентов приведены эти графики.
- рис. 25 содержит 4 графика. Непонятно, каким образцам и библиотекам они соответствуют.

2. В диссертации в разделе "Материалы и методы" не указано, сколько и каких библиотек МСК было сделано. В тексте, стр. 137, написано:

В результате секвенирования было получено 32 файла, для каждого образца по 8 файлов.

В диссертации не указано, какие конкретно образцы. Было бы понятнее:

- дать каждому образцу идентификатор;

- привести сводную таблицу, в которой описать образец, условия культивирования, полученные из него библиотеки, повторы и результаты секвенирования.
3. В диссертации не указано, были ли выложены результаты секвенирования в какую-либо из международных баз данных.
 4. Было бы полезно представить все этапы биоинформатического анализа в виде единой схемы.
 5. Воспроизводимость результатов. Было бы полезно представить проведенный биоинформатический анализ в виде сценариев на одном из созданных для этого языков (CWL, WDL или Nextflow) и создать git репозиторий, откуда можно было бы скачать эти сценарии.

6. стр. 146

В результате кластеризации клеток образца МСК, культивируемых в профибротических условиях получено 6 кластеров (Рис. 27)

В диссертации не указано, какой образец (из какого пациента, из какого повтора, из какой библиотеки) использовался. Это же замечание касается и других, подобных рисунков.

Также нет информации, насколько воспроизводится такое разбиение на кластеры в других образцах.

7. стр. 148

Среднее значение и кратность изменения уровня экспрессии гена АСТА2 в кластерах 2 и 4 в среднем выше более, чем в 7 раз.

Не указано, относительно чего выше уровень экспрессии гена АСТА2 в кластерах 2 и 4. В таблице 6 для кластеров 2 и 4 приведен

avg_log2FC относительно всех клеток образца и он составил 0.78, тогда $2^{0.78}=1.71$.

8. При описании дифференциально экспрессирующихся генов автор использует пороговые значения avg_log2FC (0.6, 0.4 и даже 0.25 для разных кластеров). Желательно подробно обосновать выбор этих пороговых значений и везде указывать не только кратность изменения, но и скорректированные p-значения (padj).

9. стр. 152

На рисунке видно, что в образце выделяются две субпопуляции по ключевому маркеру миофибробластов – aSMA. На графике МСК с высоким уровнем экспрессии гена АСТА2 преимущественно располагаются в 1 кластере. В 0, 2 и 3 кластерах сосредоточились МСК с низким уровнем экспрессии гена АСТА2 (Табл. 11).

На мой взгляд, и согласно таблице 11 четко выделяется 2 кластер, в котором экспрессия гена АСТА2 существенно снижена.

Хотя кластеры были выделены, далее не последовало какого-то анализа этих кластеров.

10. Интерпретация RNA velocity. При анализе графиков RNA velocity для маркеров миофибробластов (рис. 32) автор отмечает, что экспрессия гена TAGLN «начал подвергаться деградации». Эта интерпретация требует более осторожной формулировки, так как RNA velocity показывает соотношение сплайсированных и несплайсированных форм РНК в момент секвенирования, а не непосредственно процесс деградации.

11. В результатах часто сложно понять, кластер какого образца имеется в виду. Также не указано, к какому пациенту относится образец. Было бы полезно как-то пронумеровать образцы и единообразно ссылаться на них.

12. В диссертации не указано, насколько воспроизводятся результаты кластеризации для 2 пациентов, поскольку приводятся только кластеризация для отдельных образцов.

Несмотря на отмеченные замечания, следует подчеркнуть, что они носят частный характер и не умаляют общей высокой научной ценности работы.

Достоверность результатов

Достоверность полученных результатов обеспечивается использованием современных и валидированных методов исследования, достаточным объемом экспериментального материала (от 4 до 10 тысяч клеток на образец, более 2000 клеток проанализировано в каждом эксперименте), воспроизводимостью основных результатов на материале от разных доноров, применением адекватных методов статистической обработки данных и соответствием полученных результатов современным представлениям о биологии МСК и механизмах развития фиброза.

Применение нескольких независимых подходов к типированию клеток и идентификации дифференциально экспрессирующихся генов, а также использование различных алгоритмов для анализа траекторий развития (Slingshot, PAGA) повышает надежность полученных результатов.

Оформление диссертации и автореферата

Диссертация оформлена в соответствии с требованиями, предъявляемыми к работам такого рода. Структура диссертации логична и включает введение, обзор литературы (интересный, но излишне большой 116 страниц), описание материалов и методов, изложение результатов и их обсуждение, заключение, выводы и список литературы. Текст написан

грамотным научным языком, изложение материала последовательное и логичное.

Список литературы достаточно полон и включает как классические, так и современные работы по теме исследования, что свидетельствует о хорошем знании автором состояния проблемы.

Содержание автореферата соответствует содержанию диссертации.

Соответствие диссертации паспорту специальности

Диссертационная работа М.С. Арбатского полностью соответствует паспорту научной специальности 1.5.8 – Математическая биология, биоинформатика (биологические науки). Работа посвящена применению современных методов биоинформатического анализа для исследования фундаментальных биологических процессов – дифференцировки и функционирования мезенхимных стромальных клеток.

В работе использован широкий спектр биоинформатических методов и алгоритмов: методы снижения размерности данных (PCA, t-SNE, UMAP), алгоритмы кластеризации (Louvain algorithm, SLM), методы интеграции данных (canonical correlation analysis), анализа дифференциальной экспрессии генов, построения траекторий развития клеток (Slingshot, PAGA), анализа транскрипционной динамики (RNA velocity), идентификации регуляторных сетей (SCENIC), а также методы функционального обогащения (Gene Ontology, KEGG, Reactome).

Работа вносит существенный вклад в развитие методов анализа данных одноклеточного секвенирования РНК, в частности, предложен комплексный подход к типированию клеток, сочетающий автоматические методы, анализ специфических маркеров и оценку биологических процессов.

Результаты работы имеют важное значение для понимания молекулярных механизмов развития фиброза и могут быть использованы для разработки новых подходов к терапии фибrotических заболеваний.

Заключение

Представленная диссертационная работа М.С. Арбатского является завершённым научным исследованием, в котором с использованием современных методов одноклеточной транскриптомики и биоинформатического анализа решена актуальная научная задача – выяснены механизмы развития гетерогенного ответа мезенхимных стромальных клеток на профибротические стимулы.

Основные научные результаты работы:

Впервые показано существование дискретных субпопуляций МСК, различающихся по способности дифференцироваться в миофибробласты при культивировании в профибротическом микроокружении.

Охарактеризован транскриптомный профиль α -SMA-негативной субпопуляции МСК, выявлены её функциональные особенности, связанные с деградацией внеклеточного матрикса, регуляцией ангиогенеза и метаболических процессов.

Идентифицированы регуляторные молекулы (днРНК LINC01705, микроРНК, транскрипционные факторы), потенциально вовлеченные в формирование антифибротического фенотипа МСК.

Установлены мембранные маркеры субпопуляций МСК, которые могут быть использованы для их разделения методом клеточного сортирования.

Предложен подход к прогнозированию склонности к развитию фиброза на основе экспресс-анализа данных scRNA-seq.

Работа выполнена на высоком научном и методическом уровне, результаты достоверны и имеют как фундаментальное, так и прикладное значение. Диссертация оформлена в соответствии с требованиями, предъявляемыми к работам такого рода.

Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам

подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 1.5.8 Математическая биология, биоинформатика (по биологическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова. Диссертационное исследование оформлено согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

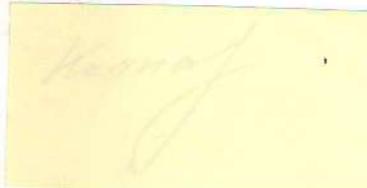
Таким образом, соискатель Арбатский Михаил Спартакович заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.8 Математическая биология, биоинформатика.

Официальный оппонент:

Доктор биологических наук,
Научный руководитель,
направление «Вычислительная биология»,
Научный центр генетики и наук о жизни,
Научно-технологический университет «Сириус»

Колпаков Федор Анатольевич

20.02.2026



Контактные данные:

тел.: +7(913)9431694, e-mail: kolpakov.fa@talantiuspeh.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация:

1.5.8 Математическая биология, биоинформатика

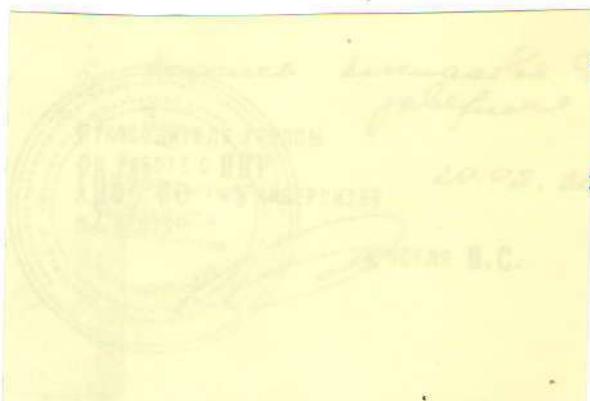
Адрес места работы:

354340, Краснодарский край, федеральная территория «Сириус», ул.

Олимпийский проспект, д. 1,

Автономная некоммерческая образовательная организация высшего
образования «Научно-технологический университет «Сириус», научный
центр генетики и наук о жизни, направление «Вычислительная биология»

Тел.: +7(913)9431694; e-mail: kolpakov.fa@talantiuspeh.ru



№11А

226