

О Т З Ы В

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 исследования. Диссертационное исследование Адели Альбертовны Галиакберовой посвящено разработке подходов к дифференцировке индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) человека в нейроны в условиях *in vitro* и представляет собой актуальное направление современной биомедицины и клеточной биологии. Нейрогенез *in vitro* в значительной степени повторяет нейрогенез в процессе развития человека и животных, поэтому понимание молекулярных механизмов и принципов регуляции нейрогенеза *in vitro* может пролить свет на механизмы дифференцировки нейронов в процессе филогенеза. С другой стороны, использование ИПСК человека для их дифференцировки в нейроны открывает новые возможности для создания индивидуальных моделей заболеваний, которые основаны на клетках конкретного пациента. Это позволяет не только глубже изучать механизм развития болезни, но и разрабатывать индивидуальные подходы к лечению и тестировать персонализированные лекарственные препараты. ИПСК могут быть получены из соматических клеток пациента, что позволяет воссоздать в лабораторных условиях модели конкретного заболевания на клеточном уровне. Это особенно важно для изучения генетически обусловленных неврологических и нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Паркинсона, Альцгеймера или боковой амиотрофической склероз. Благодаря таким моделям можно исследовать патогенез заболевания, а также испытывать различные стратегии лечения.

Нейрональные культуры, полученные из ИПСК пациента, могут использоваться для высокопроизводительного скрининга лекарств. Это

позволяет оценивать эффективность и безопасность различных препаратов на клетках конкретного человека, тем самым подбирая наиболее подходящую терапию для каждого пациента. Такой подход значительно снижает риск побочных эффектов и увеличивает шансы на успех лечения.

Использование ИПСК, генетически модифицированных для коррекции генетических дефектов, может стать основой для разработки методов генной терапии. Это особенно актуально для наследственных заболеваний нервной системы. Работа, описанная в диссертации, демонстрирует возможности использования таких технологий для восстановления функциональности клеток.

Исследование особенностей дифференцировки нейрональных клеток может помочь в поиске новых биомаркеров для ранней диагностики неврологических заболеваний. Персонализированные подходы к диагностике позволят разрабатывать методы раннего выявления предрасположенности к развитию таких заболеваний.

Таким образом, разработка эффективных методик для дифференцировки нейронов из плюрипотентных стволовых клеток является актуальной и значимой задачей не только с точки зрения фундаментальной науки, но и с точки зрения практического применения, в том числе для моделирования различных заболеваний нервной системы и разработки методов их лечения, для развития персонализированной медицины.

Структура и содержание работы. Диссертационная работа изложена на 173 страницах и состоит из традиционных разделов. Во введении диссертант раскрывает актуальность темы исследования, формулирует цели и задачи работы, обосновывает её научную и практическую значимость, указывает на новизну подходов. Также в данном разделе представлены положения, выносимые на защиту.

Обзор литературы посвящен детальному обзору существующих исследований и теоретических представлений по теме нейрогенеза и использования ИПСК. Автор подробно описывает процесс эмбрионального и постнатального нейрогенеза, функциональные характеристики нейральных стволовых клеток (НСК), а также ключевые сигнальные пути, вовлеченные в дифференцировку нейронов. Особое внимание уделено современным методам дифференцировки нейронов *in vitro* с использованием плюрипотентных стволовых клеток. Обзор богато иллюстрирован, что значительно облегчает прочтение материала. Этот раздел демонстрирует широкий кругозор автора и его способность работать с большим объемом научной информации.

Глава “Материалы и методы” содержит подробное описание экспериментальных подходов, применённых в работе. Для дифференцировки ИПСК в нейроны автор использовал современные клеточные и молекулярные технологии, такие как метод DUAL SMAD ингибирования и метод экзогенной гиперэкспрессии NGN2. Характеризация дифференцированных нейронов осуществлялась с применением методов РНК-секвенирования, иммуноцитохимического окрашивания, количественной ПЦР и кальциевого имиджинга. Методы описаны достаточно подробно, описание включает все необходимые этапы экспериментов, что позволяет воспроизвести проведенные исследования.

Основные результаты работы изложены в четкой и логичной форме. Автору удалось продемонстрировать различия в результатах двух подходов к дифференцировке ИПСК. Было показано, что метод DUAL SMAD ингибирования позволяет получить крайне гетерогенные нейрональные культуры, в то время как экзогенная гиперэкспрессия NGN2 даёт более однородные культуры зрелых нейронов, однако не все типы нейронов могут быть получены таким образом. Впервые показано, что длительность культивирования НСК оказывает влияние на состав и характеристики

дифференцированных клеточных культур, а именно продемонстрировано, что в процессе длительного культивирования линии НСК-KYOU наблюдается значимое истощение популяций глиальных клеток и обогащение некоторых популяций нейральных стволовых клеток. Сделанные выводы базируются на колоссальном объеме данных, полученных с использованием широкого набора методов: транскриптомного анализа всей популяции клеток, а также индивидуальных нейронов, метода ОТ-ПЦР на широкий набор генов, а также иммуноцитохимического окрашивания, направленного на выявление тех или иных маркеров, характерных для различных типов клеток. Значительно украшает данную работу применение оптической регистрации уровней кальция и натрия в дифференцированных нейронах. Глава «Результаты» содержит большое количество графиков, диаграмм и фотографий, которые наглядно иллюстрируют результаты экспериментов. Полученные данные тщательно проанализированы и обработаны с применением адекватных статистических методов.

Обсуждение результатов. Данная глава содержит анализ полученных данных в контексте существующих исследований. Автор обсуждает преимущества и недостатки двух методов дифференцировки ИПСК и делает вывод о том, что оба метода имеют свои сильные и слабые стороны в зависимости от конкретных задач. Обсуждение включает рассуждения о потенциальных возможностях применения полученных нейрональных культур для моделирования заболеваний нервной системы и тестирования лекарственных препаратов. Автор демонстрирует критическое мышление и способность к объективной оценке полученных результатов.

В заключении автор подводит итог проделанной работы, резюмирует основные выводы и формулирует практические рекомендации для дальнейшего использования нейрональных культур, полученных из ИПСК. Выводы логично вытекают из поставленных целей и задач и подтверждаются экспериментальными данными. Автором предложены перспективы

дальнейших исследований в данной области клеточной биологии и медицины.

Анализ степени достоверности и обоснованности результатов, выводов и положений, выносимых на защиту

Полученные результаты диссертационного исследования характеризуются высокой степенью достоверности. Диссертация базируется на большом количестве экспериментов, выполненных с использованием современных методов молекулярной биологии и клеточных технологий. Статистическая обработка данных проведена корректно, результаты представлены в форме графиков, таблиц и рисунков, что позволяет наглядно оценить их достоверность. Кроме того, диссертант опирается на актуальные данные мировой научной литературы, что подтверждает тщательность проведенного анализа и достоверность выводов.

Положения, выносимые на защиту, глубоко обоснованы как с теоретической, так и с экспериментальной точки зрения. В диссертации представлены результаты сравнительного анализа двух основных подходов к дифференцировке нейронов: метода с DUAL SMAD ингибированием и метода с гиперэкспрессией NGN2. Диссертантом продемонстрировано, что оба подхода имеют свои преимущества и недостатки, что является важным выводом для дальнейшего применения этих методов в исследовательской и практической деятельности.

Научные выводы диссертации логично вытекают из поставленных задач и выполненных экспериментов. В частности, автор показал, что продолжительное культивирование нейральных стволовых клеток (НСК), полученных из ИПСК, ведет к изменению их клеточного состава и функциональных характеристик, что является важным вкладом в понимание механизмов клеточной дифференцировки. Также диссертант показал, что использование экзогенной гиперэкспрессии NGN2 позволяет получать более однородные популяции нейронов, что может быть полезно при разработке

нейрональных моделей для изучения патогенеза различных заболеваний. Эти выводы могут стать основой для разработки рекомендаций по выбору оптимальных методов для конкретных исследовательских задач, связанных с нейрогенезом *in vitro*.

Научная новизна, теоретическая и практическая значимость полученных результатов

Теоретическая значимость работы состоит в том, что полученные в ней данные проливают свет на клеточные и молекулярные механизмы нейрогенеза человека. Практическая значимость определяется открываемыми возможностями дифференцировки ИПСК, полученных из соматических клеток пациента, в нейроны. Подобные технологии открывают двери для персонализированной медицины, позволяющей осуществлять подбор индивидуальных методов лечения для каждого конкретного пациента. Кроме того, нейрональные культуры, дифференцированные из ИПСК пациентов, позволят проводить изучение механизмов патогенеза заболеваний.

Несмотря на общее положительное впечатление от диссертационного исследования в процессе прочтения работы у меня возникло несколько вопросов и замечаний, носящих исключительно дискуссионный характер.

Вопросы и замечания

1. Главной особенностью нейронов, определяющей, в том числе, их функциональную полноценность, является их способность генерировать потенциалы действия. В диссертации вопрос, обладают ли полученные в результате дифференцировки из ИПСК нейроны этой особенностью, практически не обсуждается, также не предпринимаются попытки показать это экспериментально. Предполагает ли автор, что полученные в ее экспериментах нейроны способны к генерации потенциалов действия? Отмечается ли экспрессия генов потенциал-зависимых натриевых и калиевых каналов в дифференцированных нейронах? Если да, похож ли паттерн

экспрессии генов этих каналов на паттерн, характерный для нейронов в составе мозга? В идеале для ответа на данный вопрос необходимо было бы поставить эксперименты с внутриклеточной регистрацией активности клеток, например, при помощи метода patch-clamp. Однако даже при использовании кальциевого имиджинга, который широко применялся в работе, можно было бы попытаться зарегистрировать кальциевые события, соответствующие одиночным потенциалам действия, возникающим спонтанно или в ответ на ту или иную химическую стимуляцию (KCl или глутаматом). Предпринимались ли попытки провести подобные эксперименты?

2. При обсуждении результатов экспериментов с кальциевым и натриевым имиджингом и глутамат-индуцированными ответами полученные результаты постоянно сравниваются с данными, полученными в работах по изучению отставленной кальциевой дисрегуляции (delayed calcium dysregulation (DCD)) на нейронах первичной культуры (Sharipov et al., 2018; Brittain et al., 2012). При этом основной эффект DCD развивается через 20 и более минут после аппликации глутамата, в то время как в данном диссертационном исследовании регистрация ограничивалась 8-10 минутами после аппликации. С чем были связаны относительно короткие времена записи в вашей работе и не предпринимались ли попытки более длительной регистрации?

3. В работе Brittain et al., 2012 блокаторы NMDA каналов устраняли кальциевый ответ на аппликацию глутамата, однако не влияли на натриевый. В ваших экспериментах блокаторы глутаматных каналов значительно уменьшали как кальциевый, так и натриевый ответы. Как вы можете объяснить такое расхождение?

4. На рисунке 20Б представлено изображение дифференцированных нейронов, окрашенных антителами на синаптофизин. На фотографии хорошо видны иммунореактивные дендриты с дендритными шипиками, которые представляют собой постсинаптические структуры. При этом известно, что синаптофизин является пресинаптическим белком и обычно локализуется в

пресинаптических аксонных терминалях. Как можно объяснить данное противоречие?

5. На мой взгляд, работа бы значительно выиграла, если бы выводы и положения, выносимые на защиту, были бы более конкретными, а не написаны общими словами. Например, вывод «Длительность культивирования НСК влияет на клеточный спектр получаемых из них нейральных культур» мог бы быть сформулирован более конкретно, например: «в процессе длительного культивирования линии НСК-KYOU наблюдается значимое истощение популяций глиальных клеток и обогащение некоторых популяций нейральных стволовых клеток». Также, на мой взгляд, при таком значительном объеме полученных экспериментальных данных самих выводов могло бы быть больше.

Заключение

Указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертационная работа Галиакберовой Адели Альбертовны "Подходы к моделированию нейрогенеза *in vitro* при помощи индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека" является завершенным научным исследованием, в котором достигнуты поставленные цели, сформулированы четкие выводы и даны рекомендации для дальнейших исследований. Работа характеризуется высокой степенью актуальности, новизны и достоверности, а также имеет как теоретическое, так и практическое значение для клеточной биологии и биомедицины. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М. В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 1.5.22 – Клеточная биология (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, а также оформлена согласно требованиям Положения о совете 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,
профессор РАН,
директор Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии Российской академии наук

27 сентября 2024 г.

Малышев Алексей Юрьевич



Подпись А.Ю. Малышева
УДОСТОВЕРЯЮ
Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии
ИВНД и НФ РАН
Гиню
Кузнецова Т.И.

Контактная информация:

Почтовый адрес: ИВНД и НФ РАН, Москва 117485, ул. Бутлерова, дом.5А

Тел.: +7(8)

02 e-mail:

@ihna.ru