

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора биологических наук, профессора РАН, заведующего лабораторией биологии стромальных клеток опухолей научно-исследовательского института канцерогенеза федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации Грачева Алексея Николаевича на диссертационную работу Хотиной Виктории Александровны «Изучение роли митохондриального генома в формировании проатеросклеротического фенотипа моноцитоподобных клеток линии ТНР-1 и созданных на их основе цитоплазматических гибридов», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 3.3.3. Патологическая физиология

Актуальность исследования

Атеросклероз занимает центральное место среди хронических заболеваний, приводящих к развитию сердечно-сосудистых патологий, которые остаются основной причиной смертности населения по всему миру. Несмотря на значительные успехи медицины в разработке методов лечения, точные механизмы развития атеросклероза до сих пор остаются предметом интенсивных научных исследований. В основе атеросклероза лежат нарушения липидного обмена, эндотелиальной функции, хронического воспаления и окислительного стресса. Сложность атерогенеза обусловлена его многофакторной природой, включающей генетические, метаболические и воспалительные аспекты. Особенно важным направлением является изучение роли митохондрий в этих процессах, так как данные органеллы обеспечивают клеточную энергетику, участвуют в регуляции апоптоза и воспалительных реакциях, а их дисфункция может служить триггером для патологических изменений.

Недавние исследования продемонстрировали, что мутации в митохондриальной ДНК (мтДНК) могут быть тесно связаны с развитием сердечно-сосудистых заболеваний, включая ишемическую болезнь сердца и атеросклероз. Важность изучения митохондриальных мутаций

подчеркивается тем, что они могут играть роль в патогенезе заболевания за счет нарушения процессов энергетического обмена и индукции развития воспалительных реакций. Например, мутации, такие как m.5711A>G, m.5568A>G, m.5592A>G и m.8326A>G, обнаруженные у больных с ишемической болезнью сердца и атеросклерозом в генах, кодирующих тРНК^{Asn}, тРНК^{Trp}, тРНК^{Ala} и тРНК^{Lys} соответственно, могут приводить к снижению эффективности трансляции и развитию дисфункции митохондрий. Кроме того, известна делеция mtDNA4977, затрагивающая ключевые компоненты дыхательной цепи, которая также обнаруживается у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями, и ассоциирована со снижением числа копий мтДНК. Эти данные открывают перспективы для использования широкого спектра митохондриальных мутаций как маркеров риска и потенциальных мишеней для терапии, подчеркивая необходимость дальнейших исследований в этой области.

Это диссертационное исследование направлено на устранение пробела в знаниях, поскольку понимание механизма влияния мутации m.15059G>A на метаболизм и функциональную активность моноцитоподобных клеток открывает новые перспективы для разработки терапевтических подходов. Так, ранее было установлено, что мутация m.15059G>A в гене *MT-CYB*, приводит к укорочению цитохрома b и нарушению работы III комплекса электрон-транспортной цепи. Данная мутация была выявлена в клетках атеросклеротических поражений, а также коррелирует с такими клиническими маркерами, как утолщение сосудистой стенки и артериальная гипертензия. Однако связь между этой мутацией, нарушением митохондриальных функций и формированием проатеросклеротического клеточного фенотипа была изучена недостаточно.

Углубленное изучение мутаций митохондриального генома может позволить не только понять фундаментальные аспекты патогенеза атеросклероза, но и предложить инновационные стратегии диагностики и лечения, нацеленные на предотвращение прогрессирования заболевания.

Степень обоснованности научных положений и выводов, сформулированных в диссертации

Сформулированные автором задачи соответствуют поставленной цели исследования. Представленные в диссертации научные положения и выводы базируются на тщательной и всесторонней экспериментальной работе. Автор демонстрирует последовательный подход к решению поставленных задач, начиная с изучения фундаментальных биоэнергетических изменений в митохондриях клеток и заканчивая анализом их функциональной активности в контексте атеросклероза. Применение таких современных методов, как редактирование митохондриального генома с использованием системы CRISPR/Cas9 (MitoCas9), является важным доказательством научной обоснованности результатов. Это позволило автору провести целенаправленный анализ влияния мутации m.15059G>A на функции митохондрий и проатеросклеротический фенотип клеток.

Обоснованность выводов подтверждается проведенными экспериментами и соблюдением методологических стандартов. Представленные автором в диссертации данные демонстрируют высокий уровень воспроизводимости и достоверности. Так, доказательство влияния мутации m.15059G>A на митохондриальную функцию, воспалительный ответ и экспрессию генов, регулирующих апоптоз, основывается на тщательном анализе большого объёма данных.

Положения, выносимые на защиту, основаны на результатах, полученных в ходе исследования, и представляются в достаточной мере аргументированными. Выводы диссертации соответствуют заявленным цели и задачам, логично вытекают из полученных экспериментальных данных и согласуются с положениями, выносимыми на защиту. Таким образом, сформулированные положения имеют научную обоснованность и подтверждены убедительными экспериментальными результатами.

Материалы диссертационного исследования в необходимом объёме представлены в публикациях в высокорейтинговых и профильных научных изданиях, в том числе в журналах, рекомендованных ВАК для опубликования результатов диссертаций на соискание учёных степеней, и приравненных к

ним изданиях. Результаты были обсуждены и апробированы на конференциях международного уровня и опубликованы в сборниках докладов.

Автореферат диссертации содержит все необходимые разделы и в полной мере отражает содержание диссертации, оформлен в соответствии с существующими требованиями.

Достоверность и научная новизна

Достоверность полученных результатов подтверждается достаточным объемом экспериментального материала, полученным различными методами, а также обеспечивается применением современных экспериментальных подходов. Автор использовал адекватные модели, такие как цитоплазматические гибриды (цибриды), что позволило достоверно воспроизвести ключевые клеточные и молекулярные изменения, связанные с мутацией *m.15059G>A*. Для обработки полученных данных автором были применены современные методы статистического анализа. Статистическая обработка результатов выполнена с учетом характера распределения полученных данных, для решения конкретных задач в каждом эксперименте применяли необходимый тип анализа.

Научная новизна работы заключается в изучении функциональных последствий мутации *m.15059G>A* в гене *MT-CYB*, что ранее не было продемонстрировано. В диссертационном исследовании впервые показано, что данная мутация вносит вклад в нарушение митофагии, усиление окислительного стресса и изменение профиля воспалительного ответа, что влияет на формирование проатеросклеротического фенотипа моноцитоподобных клеток. Использование технологии CRISPR/Cas9 (MitoCas9) является важным подходом, открывающим перспективы для дальнейшего изучения митохондриальных мутаций в контексте различных заболеваний.

Результаты, полученные автором, углубляют понимание молекулярных механизмов атерогенеза и могут послужить основой для разработки терапевтических стратегий, направленных на устранение митохондриальной дисфункции.

Таким образом, диссертация отличается оригинальностью подхода, высокой степенью достоверности результатов и значительным вкладом в развитие современной науки о патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний.

Краткая характеристика основного содержания диссертации

Диссертационная работа В.А. Хотиной имеет классическое строение и включает в себя введение, обзор литературы, главы «Материалы и методы», «Результаты исследования» и «Обсуждение результатов» с соответствующими подразделами, заключение, выводы, список сокращений и список литературы, содержащий 22 отечественных и 296 иностранных источников. Материалы диссертации изложены на 193 страницах текста, включают 32 рисунка и 9 таблиц.

Во введении автор формулирует цели и задачи исследования, подчеркивает актуальность исследуемой проблемы, характеризует степень научной новизны, теоретическую и практическую значимость. Основные положения, выносимые на защиту, определяются автором в соответствии с поставленными целями исследования.

В первой главе автор представляет обзор актуальных литературных данных по тематике исследования. Автор анализирует ключевые аспекты патогенеза атеросклероза, включая роль клеточных компонентов, и ассоциированных с сердечно-сосудистыми заболеваниями мутаций митохондриального генома. Также особое внимание уделено моделированию процессов, связанных с атерогенезом и освещению современных подходов к редактированию митохондриального генома.

Глава «Материалы и методы» посвящена описанию методов исследования, применяемых в работе. Также приводится подробное описание методов статистической обработки полученных данных.

Глава «Результаты исследования» разделена на 13 подразделов и представляет основные экспериментальные данные, полученные в ходе работы. Автор подробно описывает применение системы MitoCas9 для удаления мтДНК с мутацией m.15059G>A и характеризует полученные клетки. Продемонстрированы последствия наличия данной мутации в

моноцитоподобных клетках, такие как митохондриальная дисфункция, усиление генерации активных форм кислорода, нарушения митофагии, а также изменения в экспрессии генов, регулирующих воспалительные процессы, липидный обмен и апоптоз. Несмотря на обширность представленного материала, автор логично структурирует результаты, что позволяет легко проследить взаимосвязь между отдельными аспектами работы.

Глава «Обсуждение результатов» посвящена обсуждению полученных автором данных, в ходе которого проводится их сопоставление с существующими литературными данными. Автор критически оценивает значение митохондриальных мутаций в патогенезе атеросклероза и рассматривает возможные пути для дальнейших исследований в данной области.

Диссертационная работа завершается заключением и выводами, которые в полной мере отражают цели исследования и подтверждают его научную новизну.

В целом диссертация В.А. Хотиной представляет собой завершённое исследование, решающее важные проблемы, связанные с пониманием механизма атеросклероза и возможными стратегиями его лечения.

Замечания и вопросы по диссертации

Замечаний принципиального характера к работе нет, однако можно выделить несколько аспектов, требующих дополнительного обсуждения и проработки, что позволило бы повысить научную строгость и практическую ценность исследования:

1. Цибриды представляют собой удачный инструмент для изучения митохондриальных функций, но в тексте отсутствует детальное обоснование выбора линии ТНР-1 и её производной линии ТС-HSMAM1 для экспериментов.
2. Для оценки митофагии применялся анализ колокализации митохондрий и лизосом. Однако из описания не ясно, проводился ли количественный

анализ или ограничивались качественной оценкой, что может влиять на объективность полученных данных.

3. При проведении количественной ПЦР была использована программа амплификации, применяемая в реакциях с гидролизуемыми зондами (температура отжига/синтеза – 60°C), однако для детекции использовался интеркалирующий краситель, что позволяет использовать температуру элонгации 72°C, обеспечивающую более высокую эффективность полимеразы. Также не указано, на каком этапе программы проводилось считывание данных. В случае интеркалирующего красителя принципиально считывать данные в конце стадии элонгации.
4. Для анализа данных количественной ПЦР использовалась методика ddCt, которая требует одинаковой эффективности ПЦР-реакций для исследуемых генов и генов домашнего хозяйства. Однако данные о проверке эффективности амплификации в тексте не приведены.

Заключение

Диссертационная работа Хотиной Виктории Александровны «Изучение роли митохондриального генома в формировании проатеросклеротического фенотипа моноцитоподобных клеток линии ТНР-1 и созданных на их основе цитоплазматических гибридов», является законченной научно-квалификационной работой. По актуальности темы, новизне полученных данных и их научно-практической значимости диссертационная работа полностью соответствует требованиям пунктов 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней» (в редакции постановлений Правительства Российской Федерации от 21.04.2016 №335, от 02.08.2016 №748, от 29.05.2017 №650, от 28.08.2017 №1024, от 01.10.2018 №1168, от 20.03.2021 №426), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени

кандидата биологических наук по специальности 3.3.3. Патологическая физиология.

Официальный оппонент

Доктор биологических наук (14.00.14 - онкология), профессор РАН, заведующий лабораторией биологии стромальных клеток опухолей научно-исследовательского института канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии имени Н.Н. Блохина» Минздрава России

29.01.25

дата



подпись

Грачев Алексей Николаевич

Подпись д.б.н. Грачева А.Н. заверяю

Ученый секретарь ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, кандидат медицинских наук



Кубасова И.Ю.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

115522, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24, +7 (499) 324-24-24
info@ronc.ru, www.ronc.ru