

## **ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА**

на диссертационную работу Хотиной Виктории Александровны «Изучение роли митохондриального генома в формировании проатеросклеротического фенотипа моноцитоподобных клеток линии THP-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 является одной из ведущих причин развития сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ), которые занимают первое место среди причин смертности и инвалидизации населения в современном обществе. Важность понимания механизмов атерогенеза усиливается на фоне растущей заболеваемости и ограниченной эффективности современных профилактических и терапевтических подходов. Традиционно патогенез атеросклероза связывают с нарушениями липидного обмена и хроническим воспалением, поражающим сосудистую стенку на всех этапах формирования атеросклеротических поражений. Однако современные данные указывают на сложную многофакторную природу этого заболевания, значительную роль в которой играют генетические и эпигенетические факторы.

Одним из перспективных направлений исследований является изучение роли мутаций митохондриального генома в патогенезе атеросклероза. Роль митохондриальной дисфункции в патогенезе атеросклероза в последние годы привлекла значительное внимание, особенно в связи с накоплением данных о влиянии мутаций митохондриальной ДНК (мтДНК) на ключевые клеточные процессы, такие как окислительное фосфорилирование, аутофагия и воспалительные реакции. Митохондрии играют ключевую роль в энергетическом метаболизме, регуляции апоптоза и воспалительных процессов, которые тесно связаны с развитием атеросклеротических поражений. В последние годы выявлена связь между мутациями мтДНК и



ССЗ, включая ишемическую болезнь сердца, инфаркт миокарда и атеросклероз. Например, выявлены мутации в мтДНК, оказывающие влияние на патогенез ССЗ, включая мутации в генах, кодирующих различные тРНК (m.5592A>G и m.5024C>T в *MT-TA*, m.15927G>A в *MT-TT*), которые ассоциированы с кардиомиопатиями и увеличением продукции активных форм кислорода. Также показано, что гетероплазматические и гомоплазматические мутации в генах *MT-ND1* и *MT-ND2* связаны с повышенным риском артериальной гипертензии, что подчеркивает разнообразие механизмов, посредством которых нарушения в митохондриальном геноме способствуют прогрессированию атеросклероза и развитию его осложнений. Кроме того, исследованная в данной работе мутация m.15059G>A в гене *MT-CYB*, которая приводит к дисфункции III комплекса электрон-транспортной цепи митохондрий, была обнаружена в лейкоцитах и клетках атеросклеротических бляшек, а также продемонстрировала корреляцию с гипертензией и толщиной интима-медии у пациентов с атеросклерозом.

Несмотря на значительный прогресс в изучении генетических факторов атерогенеза, связь функциональных последствий митохондриальных мутаций с метаболизмом и фенотипическими изменениями клеток остаётся недостаточно изученной. В частности, это касается процессов, лежащих в основе формирования проатеросклеротического фенотипа клеток, составляющих атеросклеротические поражения. Учитывая, что митохондриальные дисфункции могут служить как маркерами, так и терапевтическими мишенями при атеросклерозе, дальнейшее изучение данной области представляет собой актуальную задачу современной биомедицины.

#### **Степень обоснованности научных положений и выводов, сформулированных в диссертации**

Анализ многочисленных научных зарубежных и отечественных публикаций по тематике диссертационной работы, полученные в диссертации



результаты, их обсуждение, а также выводы позволяют заключить, что в целом, рассматриваемая диссертация является завершённым исследованием, отличающимся новизной, имеющим научную и практическую значимость.

Научные положения и выводы, представленные в диссертации, основаны на выполнении поставленных задач и обширной экспериментальной работе, которая была проведена с использованием современных методов молекулярной биологии, клеточной биологии и генетической инженерии. Применение цитоплазматических гибридов (цибридов) позволило воспроизвести ключевые аспекты митохондриальной дисфункции, связанной с мутацией m.15059G>A, в условиях, воспроизводящих патогенез атеросклероза на уровне клеток.

Методология исследования представлена на высоком уровне. Автор грамотно применила современные методы исследований, в том числе использовала такую технологию, как CRISPR/Cas9, для целенаправленного удаления мутантной мтДНК и последующего анализа клеточных и молекулярных изменений, что подтверждает валидность полученных данных. Применение широкого спектра методов, включая оценку биоэнергетических параметров митохондрий, анализ секреции цитокинов путем иммуноферментного анализа, анализ экспрессии генов с помощью ПЦР и исследование метаболической активности клеток, свидетельствует о комплексном подходе к изучению исследуемой проблемы. Кроме того, статистическая обработка проведена корректно, поэтому обоснованность и достоверность полученных результатов и выводов не вызывает сомнений.

В целом, выводы диссертации объективны, логически обоснованы и соответствуют полученным результатам. Положения, выносимые на защиту, соответствуют выводам, сформулированным автором.

Полученные автором результаты были обсуждены на конференциях международного уровня. Материалы диссертационного исследования в необходимом объёме представлены в публикациях в профильных журналах, в



том числе в журналах, рекомендованных ВАК для опубликования результатов диссертаций на соискание учёных степеней, и приравненных к ним изданиях.

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

### **Достоверность и научная новизна**

Полученные в работе результаты, их обоснованность и достоверность сомнений не вызывает. Достоверность результатов подтверждена применением современных методов анализа, тщательно описанной схемой экспериментов и корректным использованием методов статистической обработки данных. Автор провел исследования с использованием хорошо зарекомендовавших себя клеточных моделей, что повышает надежность полученных выводов. Для обоснования достоверности результатов применялись адекватные методы статистики. Полученные результаты были обработаны с помощью современных методов статистического анализа. При обработке учитывался характер распределения полученных данных, для решения конкретных задач в каждом эксперименте применяли необходимый тип анализа.

По теме диссертации автором опубликованы 26 печатных работ, в том числе 9 статей в рецензируемых журналах (8 в рецензируемых иностранных журналах и 1 статья в журнале из перечня рецензируемых научных изданий ВАК РФ), а также 17 тезисов в сборниках докладов международных научных конференций.

Научная новизна работы заключается в комплексном подходе к изучению мутации m.15059G>A в гене *MT-CYB*. Впервые исследованы функциональные последствия наличия данной мутации в митохондриальном геноме в контексте проатеросклеротического фенотипа иммунных клеток. Следует также отметить выявление связи мутации m.15059G>A с нарушением митофагии, усилением окислительного стресса и изменением



воспалительного ответа иммунных клеток. Эти результаты имеют не только фундаментальное значение, но и практическую значимость, поскольку предоставляют новые потенциальные мишени для терапевтического воздействия.

Таким образом, диссертация отличается высокой степенью новизны и достоверности. Она вносит значительный вклад в изучение роли митохондриальных мутаций в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний, а ее результаты имеют как теоретическую, так и прикладную ценность.

### **Краткая характеристика основного содержания диссертации**

Диссертация В.А. Хотиной изложена на 193 страницах машинописного текста, имеет традиционную структуру и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов и списка использованной литературы. Список литературы включает 318 источников, из которых 22 — русскоязычные и 296 — зарубежные. Работа содержит 32 рисунка и 9 таблиц, что существенно облегчает восприятие изложенного материала.

Во введении автор обосновывает актуальность исследуемой проблемы, формулирует цель и задачи работы, излагает научную новизну, теоретическую и практическую значимость исследования, формулирует положения, выносимые на защиту, а также приводит данные об апробации результатов.

Первая глава включает пять подразделов и представляет собой обзор литературы. В ней автором подробно рассмотрены механизмы развития атеросклероза, роль макрофагов и митохондриальной дисфункции в его патогенезе, а также современные подходы к редактированию митохондриального генома и моделированию атеросклероза *in vitro*.

Во второй главе автор описывает материалы и методы исследования, включая культивирование клеток, использование системы редактирования MitoCas9, молекулярно-биологические и биохимические методы,



конфокальную микроскопию, проточную цитофлуориметрию и статистическую обработку данных.

Третья глава включает 13 подразделов и содержит основные результаты исследования. В подразделе 3.1. автор описывает результаты удаления мтДНК с мутацией m.15059G>A с использованием системы MitoCas9 в цитоплазматических гибридах TC-HSMAM1. Показана высокая эффективность вектора MitoCas9 разрезать мтДНК в области гена, несущего мутацию m.15059G>A, с последующим удалением мтДНК в клетках цитоплазматических гибридов TC-HSMAM1. В результате автором были получены клетки TC-HSMAM1 с удаленной мутантной мтДНК (Cas9-TC-HSMAM1). В подразделе 3.2. автор описывает результаты исследований митохондриальной дисфункции, включая снижение уровня мембранного потенциала митохондрий, а также усиление генерации АФК и перекисного окисления липидов митохондриальной мембраны в гибридных клетках с патогенной мутацией по сравнению с клетками с удаленной мутантной мтДНК. Подраздел 3.3. включает результаты изучения митохондриального биоэнергетического профиля исследуемых клеток. Автором установлено, что в гибридах с мутацией m.15059G>A наблюдается увеличение утечки протонов и немитохондриального потребления кислорода с одновременным снижением общей митохондриальной эффективности в данных клетках. В подразделах 3.4. и 3.5 представлены результаты анализа активации митофагии в клетках гибридов с удаленной мутантной мтДНК. Показано, что в клетках с мутацией наблюдается явление дефектной митофагии в отличие от условно здоровых клеток родительской линии ТНР-1 и гибридов с удаленной мутантной мтДНК. Кроме того, автором проведен анализ изменения уровня экспрессии генов, регулирующих митофагию, включая *PINK1*, *PRKN* и *MAP1LC3B*, в клетках с мутантным и отредактированным геномами. Показано, что удаление мтДНК, несущей мутацию m.15059G>A, в гибридных клетках приводит к значительному увеличению экспрессии данных генов. В подразделе 3.6. автором описаны результаты оценки секреции провоспалительных цитокинов,



включая ФНО $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6, ИЛ-8 и MCP-1. Установлено, клетки Cas9-TC-HSMAM1 не отличаются по базальной секреции цитокинов от клеток линии TC-HSMAM1 с неотредактированным митохондриальным геномом, за исключением сниженной секреции ФНО $\alpha$ . В подразделе 3.7. автором описаны результаты исследования способности клеток формировать эндотоксиновую толерантность к липополисахаридам. Показано, что клетки с мутацией теряют способность к развитию формировать эндотоксиновую иммунную толерантность. В подразделе 3.8 автором проанализирована экспрессия генов, ассоциированных с инфламмасомой (*CASP1*, *NLRP3* и *IL1B*), что свидетельствовало о возможном участии мутации m.15059G>A в усилении про-воспалительного ответа и формировании NLRP3 инфламмасы в связи с повышенной базальной экспрессией генов *NLRP3* и *IL1B*. В подразделах 3.9 и 3.10 автором представлены результаты изучения накопления холестерина липопротеидов низкой плотности (ЛПНП) цибридными клетками и оценки экспрессии генов, участвующих в регуляции липидного метаболизма. Показано, что мутация m.15059G>A в гене *MT-CYB* не оказывает значительного влияния на внутриклеточное накопление холестерина ЛПНП клетками, поскольку удаление мтДНК не приводило к значимому изменению накопления холестерина в цибридных линиях. Тем не менее, при наличии в клетках данной мутации наблюдается изменение профиля экспрессии гена *FASN* по сравнению с родительской клеточной линией и клетками с удаленной мутантной мтДНК. В подразделе 3.11 автор исследует возможность регуляции экспрессии генов апоптоза в клетках с удаленной мутантной мтДНК. Показано, что удаление мтДНК, несущей мутацию m.15059G>A, приводит к снижению экспрессии гена *CASP3*, а также увеличению экспрессии *BAX* и *CASP9* по сравнению с линией цибридов TC-HSMAM1, несущей патогенную мутацию. Подраздел 3.12 посвящен описанию результатов изучения экспрессии генов, регулирующих пролиферацию клеток и клеточный цикл. Выявлено увеличение экспрессии гена *CCNB1*, ассоциированного с регуляцией митоза, в моноцитоподобных клетках с мутацией m.15059G>A. В



подразделе 3.13. автором была предпринята попытка проанализировать экспрессию генов, участвующих в синтетической активности и транскрипции гибридных клеток. Отмечено увеличение экспрессии генов *POLR1A* и *COL6A1* в макрофагалиных клетках с мутацией m.15059G>A в мтДНК.

Четвертая глава представляет собой обсуждение результатов исследования. Автор детально анализирует полученные в диссертационном исследовании результаты, сравнивает их с современными литературными данными и критически осмысливает роль митохондриальных мутаций в атерогенезе в контексте имеющихся данных.

Выводы, завершающие работу, логично вытекают из проведенного исследования. Полученные результаты имеют важное значение для понимания механизмов развития атеросклероза и могут быть использованы для разработки новых терапевтических подходов, направленных на коррекцию митохондриальной дисфункции. Сформулированные и выносимые на защиту положения являются логическим следствием основных результатов и сделанных автором выводов. Корректность и четкость формулировок являются сильными сторонами в завершающей части работы и не вызывают каких-либо вопросов и нареканий со стороны оппонента.

### **Замечания и вопросы по диссертации**

В рамках дискуссии целесообразно озвучить следующие вопросы и замечания:

- 1) Методология работы опирается на методы *in vitro*, которые релевантны и корректны для выяснения механизмов и оценки эффектов геномных элементов. Однако современный подход в физиологии все чаще требует использования животных моделей, которые сложны и дорогостоящи, но очень ценны для демонстрации значимости находок в культурах. Не могли бы Вы предоставить информацию о том какие могут быть применены животные модели для дальнейшего развития данного направления?



- 2) Значительный пул экспериментов выполнен с использованием дериватов линии ТНР-1, которые были индуцированы в макрофагальном направлении с помощью форбол-миристат-ацетата (ФМА). Имеются ли данные о том в каком направлении в Ваших экспериментах происходил поляризация макрофагов при дифференцировке ТНР-1 – М1 или М2?
- 3) В разделе, посвященном анализу экспрессии генов, регулирующих пролиферацию, приведена (на уровне экспрессии мРНК) находка, касающаяся гена *CCNB1*. Его экспрессия была значимо выше в клетках ТС-HSMAM1, что указывает на возможные изменения активности систем контроля пролиферации. Однако в дальнейшем эта находка не имеет развития в виде собственно оценки пролиферации, что требует пояснения.
- 4) Ряд экспериментов по количественному определению выполнен на основе анализа экспрессии методом ПЦР, а оценка по белку (методами блоттинга или ИФА) не проводилась. Насколько необходима по мнению автора в дальнейшем валидация данных ПЦР или же мощность исследования и выборки позволяют опираться на экспрессию для планирования следующих шагов в этом направлении?

Приведенные выше вопросы не умаляют значимости и научной ценности диссертации и носят дискуссионно-уточняющий характер.

### **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 завершенной научно-квалификационной работой, которая по критериям актуальности, научной новизны, обоснованности и достоверности выводов соответствует критериям,



установленным Положением о присуждения 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 биологических наук. Диссертант Хотина В.А. заслуживает присуждения ей ученой степени кандидата биологических наук по специальности 3.3.3. — Патологическая физиология.

**Официальный оппонент**

Доктор медицинских наук,  
Заведующий лабораторией генно-клеточной терапии  
Центра регенеративной медицины Медицинского  
научно-образовательного института Федерального  
государственного бюджетного образовательного  
учреждения высшего образования «Московский  
государственный университет имени М.В. Ломоносова»

31/01/2025 

дата

подпись

Макаревич Павел Игоревич

Подпись д.м.н. Макаревича П.И. заверяю

Ученый секретарь

Университетской клиники МНОИ

МГУ имени М.В. Ломоносова

Доктор медицинских наук, профессор



  
подпись

Орлова Яна Артуровна

Центр регенеративной медицины Медицинского научно-образовательного института Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

119192, Российская Федерация, Москва, Ломоносовский проспект, дом 27, корпус 10, [info@irm.msu.ru](mailto:info@irm.msu.ru), [irm.msu.ru](http://irm.msu.ru)