

**ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени
кандидата биологических наук Титовой Екатерины Валерьевны
на тему: «Действие митохондриально-направленных антиоксидантов на
трансформированные фибробласты человека в культуре»
по специальности 1.5.22 Клеточная биология**

Актуальность темы исследования.

Современное состояние исследований в области онкобиологии свидетельствует о том, что в процессе опухолевой трансформации клетки человека приобретают ряд специфических особенностей, включая генетическую нестабильность, изменение морфологии и скорости пролиферации, активацию характерных для опухолевых клеток сигнальных путей, приобретаемую способность к инвазии и метастазированию. Эти изменения сопровождаются перестройкой актинового и микротрубочкового цитоскелета, а также снижением экспрессии молекул межклеточной адгезии. Формирование мембранных структур (ламеллиподий, филоподий, рафт), важную роль в организации которых играет актин, способствует повышению инвазивного потенциала клеток и метастазированию, однако, по данным исследований последних лет, также значимо для регуляции клеточного цикла. Реорганизация актина, сопутствующая опухолевой трансформации клеток, может нарушать внутриклеточную сигнализацию и инициировать транскрипцию определенных генов, способствующих канцерогенезу. В этой связи, разработка подходов и способов воздействия на актиновый цитоскелет и адгезивный аппарат трансформированных клеток представляет существенный интерес для клеточной биологии и онкологии.

Известно, что активные формы кислорода (АФК) играют важную роль в поддержании злокачественного фенотипа, для трансформированных клеток характерен повышенный уровень митохондриальных АФК (мАФК), что, в свою очередь, влияет на сигнальные пути, поддерживающие пролиферацию и выживание клеток. Модуляция окислительно-восстановительного статуса клеток и подходы, направленные на снижение уровня АФК, являются перспективными с точки зрения подавления опухолевого роста. Группой отечественных исследователей под руководством В.П. Скулачева был разработан класс антиоксидантов семейства SkQ (производные пластохинона, связанные с липофильным катионом трифенилфосфония), способных накапливаться в митохондриях и подавлять избыточное образование в них АФК. Было показано, что соединение SkQ1 в низких наномолярных концентрациях обладает выраженным противоопухолевым

действием *in vitro* и замедляет рост опухолей *in vivo*. Однако механизмы влияния этих антиоксидантов на клеточном уровне остаются недостаточно изученными. Таким образом, тема диссертации Е.В. Титовой является актуальной с точки зрения современной молекулярной онкологии и биологии опухолевой клетки.

Объем и содержание работы.

Диссертация изложена на 154 страницах машинописного текста и включает в себя введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, результаты и их обсуждение, выводы и список литературы, содержащий 330 источников. Работа иллюстрирована 64 рисунками.

Степень обоснованности и достоверности научных положений и выводов, сформулированных в диссертации.

Положения, выносимые на защиту ясно сформулированы и хорошо обоснованы, подкрепляются 5 публикациями диссертанта в международных и отечественных рецензируемых научных изданиях. Кроме того, обоснованность научных положений и выводов подтверждается глубоким анализом 330 источников литературы. Использование современных методов клеточной и молекулярной биологии, биохимии, визуализации с использованием флуоресцентной и конфокальной микроскопии, получение и обработка *in vitro* данных, постановка экспериментов в трех и более повторах и применение методов статистической обработки результатов безусловно указывают на высокую степень обоснованности сформулированных диссертантом научных положений и выводов.

Новизна научных положений и выводов, сформулированных в диссертации.

В диссертационной работе Титовой Е.В. представлен значительный объем новых данных, обладающих как теоретической, так и практической значимостью. Впервые проведён детальный сравнительный анализ организации актинового цитоскелета (β - и γ -актиновых систем) в нормальных и трансформированных клетках и выявлены характерные особенности организации сети актина. Впервые показано, что при снижении уровня МАФК с использованием антиоксидантов семейства SkQ в трансформированных клетках происходит фенотипическая нормализация актинового цитоскелета.

Новизна работы также заключается в детальном анализе адгезивного аппарата клеток. Впервые изучено воздействие антиоксидантов SkQ на систему фокальных контактов в трансформированных клетках. Обнаружено значительное укрупнение фокальных контактов и появление «зрелых» фокальных адгезий при инкубации трансформированных клеток с SkQ, что характерно для нормальных фибробластов в

условиях культивирования *in vitro*. Этот процесс сопровождался формированием стресс фибрилл актина и рекрутированием α -гладкомышечного актина, что указывает на дифференцировку фибробластов в миофибробласты. Данные результаты обладают практической значимостью, так как фокальные контакты играют ключевую роль в миграции и инвазии клеток.

Важным результатом работы также являются данные о влиянии антиоксидантов, адресованных в митохондрии (мАО) на пролиферативную активность трансформированных клеток. Впервые показано, что уменьшение уровня митохондриальных активных форм кислорода (мАФК) под действием SkQ приводит к подавлению пролиферации как вирус-трансформированных фибробластов, так и опухолевых клеточных линий фибросаркомы *in vitro*. Так, обнаружено, что обработка клеток SkQ вызывает изменение динамики деления клеток с характерным увеличением продолжительности митоза и задержкой на стадии цитокинеза. Антипролиферативный эффект мАО частично опосредован изменением работы ключевых регуляторов клеточного цикла – комплексов APC/C и киназ семейства Auroga. Автором предложена оригинальная гипотеза о роли мАФК в поддержании опухолевого фенотипа через регуляцию актинового цитоскелета и прогрессии митоза. Полученные в ходе выполнения работы результаты вносят существенный вклад в развитие фундаментальных представлений о роли актинового цитоскелета в опухолевой прогрессии и его обратимой модификации. Кроме того, полученные в работе данные имеют практическую значимость: мАО семейства SkQ могут в дальнейшем рассматриваться как потенциальные противоопухолевые агенты нового типа.

Таким образом, полученные в диссертационной работе результаты, несомненно, обладают научной новизной и вносят существенный вклад в исследования механизмов опухолевой прогрессии и противоопухолевой активности веществ, модулирующих уровень активных форм кислорода в вирус-трансформированных и опухолевых клетках.

Вопросы и замечания.

В работе есть несколько стилистически неудачных формулировок и ошибок, а также неточностей:

1. В присутствии молекул миозина, β -актиновые системы демонстрируют большее количество сократительных взаимодействий, чем γ -актиновые, что может оказывать влияние структурные и функциональные особенности как отдельных цитоскелетных систем, так и клеток в целом (Neitmann et al., 2023).

2. Снижение p53 опосредованно через уменьшение активности FBXW7 также повышает содержание Аугога В при трансформации (Teng et al., 2012).

3. Наблюдаемая реорганизация актина сопровождается восстановлением системы β -актиновых пучков, содержащих маркеры миофибриллярной дифференцировки, клетки при этом приобретают более нормальный фенотип.» - ошибка в слове «миофибриллярной. (стр. 11).

4. В тех же условиях прооксидантного действия мАО на рост клеток первичных подкожных фибробластов человека не наблюдалось.

5. Ошибка на стр. 120: «Данные вещества индуцировали значительное увеличение количества асимметричных по форме митотических клеток с затянутой во времени телофазой/цитокinesisом и уменьшение количества нормальных митотических клеток.».

6. На стр. 121 в разделе Обсуждение автор делает вывод: «Полученные в нашей работе данные позволяют сделать предположение о возможном участии Аугога С в процессе митоза в клетках с активированным онкогеном N-Ras.», но текст предшествующего рассуждения логически не приводит к такому заключению; необходимо дополнить эти рассуждения, после которых можно сделать этот вывод.

7. В тексте диссертации есть описание: «HT1080: линия клеток фибросаркомы человека. Псевдодиплоидная, морфологически полиморфная культура, содержащая мутантный аллель онкогена N-Ras (Gupta and Stanbridge, 2001). Клетки были плохо распластаны, по периметру клеток выявлялись многочисленные участки активности края, на поверхности имелись многочисленные раффы и блебы. В культуре выявлялась популяция двуядерных клеток ($2 \pm 1,2\%$ от общего числа клеток в культуре, подробный количественный анализ описан в разделе 5.2.2). Клетки быстро делились с образованием плотного монослоя уже через сутки инкубации на субстрате, контактное торможение было нарушено (Рис. 10).» Но рисунок 10 - это описание других клеток: - Эффект мАО на морфологию культур трансформированных фибробластов. А – общий вид культуры MRC5-V1, SkQR1 (20нМ, 48 часов инкубации); фазовый контраст, масштаб 50 мкм.

8. В тексте диссертации: «RD: псевдодиплоидная культура клеток эмбриональной рабдомиосаркомы человека (McAllister et al., 1969). Клетки веретеновидной формы, мелкие по площади, занимаемой на субстрате. По периметру клеток выявлялись участки активности края, на поверхности имелись многочисленные раффы и блебы. В культуре выявлялись единичные многоядерные клетки. Культура

клеток быстро делились с образованием плотного монослоя.», но ссылки на рисунок в работе нет.

9. Неверная формулировка: «Так, SkQ1 (10 - 40нМ, 24 часов инкубации) вызывал уменьшение количества митотических клеток на стадии G1-фазы и приводил к увеличению G2/M популяции», поскольку G1-фаза является самостоятельной фазой, предшествующей фазе митоза.

Кроме того, имеется ряд пожеланий по поводу оформления рисунков и представления результатов, а также ряд вопросов:

1. В тексте диссертации: «Снижение уровня цитоплазматических АФК в присутствии SkQ1 было показано для клеток сарком HT1080 и RD методом проточной цитофлуориметрии с использованием специфического флуоресцентного красителя DCF, что согласуется с данными литературы (Antonenko et al., 2008).». Однако, хорошо было бы демонстрировать не только графики обсчета на рисунке 14, но и данные непосредственно проточной цитофлуориметрии (плоты).

2. Инкубация клеток MRC-5 с мАО не вызывала значительных изменений в организации актиновых систем (Рис. 19). На мой взгляд, есть выраженное изменение организации цитоскелета в виде потери стресс-фибрилл. Нужно было бы представить другие изображения для демонстрации данного утверждения.

3. Нами было исследовано действие антиоксидантов на организацию актинового цитоскелета в клетках MRC5-V1 и MRC5-V2. Есть ли ссылка на статью с описанием методики получения и анализа фенотипа этих клеток?

4. Рис. 22. Организация β - и γ -актиновых систем в контрольных клетках линии MRC5-V1; 72 часа инкубации; 1,2 – различные уровни фокуса (вблизи субстрата и над ядром, соответственно), 3 – совмещенная проекция 1+2; флуоресцентная микроскопия; масштаб 10 мкм. – всего на рисунке 4 изображения, но описание и номера рисунков есть только для трех. То же замечание относится к рисункам 24 и 25.

5. Рисунок 61. Изменение локализации белка Аугога В на разных стадиях митоза в контрольных клетках HT1080. Синий - ДНК, красный – α -тубулин, зеленый - Аугога В; масштаб – 10 мкм; флуоресцентная микроскопия. Несмотря на очевидность стадий митоза на данном рисунке, следовало бы все-таки подписать, какой митотической фазе соответствует каждое из трех представленных изображений.

6. В работе убедительно показано снижение активности киназ Аугога и комплекса APC/C при обработке клеток SkQ. Возникает вопрос к автору: каков возможный

механизм, связывающий снижение уровня мАФК с угнетением активности этих ключевых регуляторов митоза? Есть ли данные литературы об изменении сигнальных путей, которые могли бы приводить к подавлению экспрессии или активации Aurora B?

7. Автором продемонстрировано, что SkQ вызывает фенотипическую модуляцию и переход трансформированных фибробластов в состояние, близкое к дифференцированным миофибробластам. Насколько устойчивым и необратимым может быть этот эффект? Предполагается ли, что удаление антиоксиданта вызовет обратный переход клеток в исходное состояние, или же они могут остаться в дифференцированном состоянии? Также интересно было бы узнать мнение автора, является ли индукция миофибробластного фенотипа однозначно благоприятным событием в контексте противоопухолевой терапии. С одной стороны, миофибробласты менее пролиферативно активны; с другой, они способны ремоделировать внеклеточный матрикс, что может способствовать инвазии опухолевых клеток.

8. Следует отметить, что, в целом, результаты работы представлены на высоком уровне, микрофотографии четкие, а графики информативны. Тем не менее, следовало бы добавить стрелки на рис. 12, чтобы обозначить клетки с признаками апоптоза, которые обсуждаются в тексте. Аналогично, на изображениях телофаз (рис. 59) стрелками можно было бы указать перетяжки (мостики) между дочерними клетками, демонстрируя задержку цитокинеза.

Заключение.

Указанные выше замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация Титовой Екатерины Валерьевны на тему «Действие митохондриально-направленных антиоксидантов на трансформированные фибробласты человека в культуре» 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. 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 Титова Екатерина Валерьевна 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
Факультета фундаментальной медицины Медицинского научно-образовательного
института ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М. В.
Ломоносова»

Рубина Ксения Андреевна

12.11.2025

Контактные данные:

тел.: +79037288821, e-mail: rkseniya@mail.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом
защита диссертация:

03.03.04 – «Клеточная биология, цитология, гистология»

Адрес места работы:

119991, г. Москва, ул. Ленинские горы, д. 1,

Факультет фундаментальной медицины Медицинского научно-образовательного
института ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М. В.
Ломоносова»

Тел.: 8 (495) 939-10-00; e-mail: rkseniya@mail.ru