

УТВЕРЖДАЮ

ВРИО генерального директора Федерального государственного бюджетного учреждения Федерального научно-клинического центра физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства

Член-корр. РАН, д.б.н. Лагарькова Мария Андреевна



«    » 2021 г.

#### Отзыв ведущей организации

о научно-практической значимости диссертационной работы

МАРИИ КОНСТАНТИНОВНЫ ЖИВЕНЬ

«Модуляция экспрессии гена HIF2A в плюрипотентных стволовых клетках человека с использованием системы CRISPR/Cas9»,

представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7 – генетика.

#### Актуальность исследования

Гипоксические условия вызывают стресс в клетках и тканях, в результате чего в них развивается каскад адаптивных реакций. Адаптацией к хроническому гипоксическому состоянию является формирование новых кровеносных сосудов для улучшения оксигенации тканей. Среди чувствительных к гипоксии органов сердечная мышца занимает особое место в силу того, что кардиологические заболевания являются ведущей причиной смертности в мире. При ишемической болезни сердца (ИБС) сужаются коронарные сосуды, в результате чего развивается хроническая гипоксия в сердечной мышце, что может привести в конечном счете к инфаркту. Соответственно, восстановление кровеносного снабжения и нормальной оксигенации сердца является ключевой терапевтической задачей при ИБС.

С другой стороны, гипоксия является одним из характерных признаков опухолевых тканей. Повышение оксигенации до физиологических значений за счёт прорастания кровеносных сосудов в опухоли является признаком её прогрессии и неблагоприятным

прогностическим критерием. Таким образом, в онкологии существует проблема сдерживания ангиогенеза в опухолях.

Диссертация М. К. Живень посвящена изучению регуляции ангиогенеза в ответ на гипоксические условия, что безусловно является актуальной темой для современной биомедицины, поскольку результаты, полученные в работе, могут быть использованы при разработке новых форм терапии кардиологических и онкологических заболеваний.

### Научная новизна работы и практическая ценность результатов

В диссертационной работе М. К. Живень использовала метод CRISPR/Cas9 геномного редактирования эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) для получения изогенной клеточной модельной системы, которая может применяться для изучения роли регуляторного фактора *EIF3E* в стресс-реакции на гипоксические условия, а также в ангиогенезе. С помощью полученной клеточной модели Мария Константиновна изучала, каким образом моноаллельный нокаут гена *EIF3E* в ЭСК влияет на экспрессию факторов, индуцируемых гипоксией (HIFs). Также она изучила, как этот нокаут сказывается на способности ЭСК к дифференцировке в мезодермальном направлении и к формированию эндотелиальных клеток. В работе показано, что эндотелиальные клетки, полученные из ЭСК с нокаутом *EIF3E*, обладают повышенной способностью к формированию сосудов. Такие клетки могут использоваться в фундаментальной регенеративной медицине при разработке новых подходов к терапии хронической гипоксии. Подобная работа выполнена на ЭСК впервые. Таким образом, диссертационная работа обладает научной новизной и практической значимостью.

### Структура и краткое содержание диссертационной работы

Диссертация М. К. Живень имеет стандартную структуру. В ней есть главы «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», за изложением результатов следует отдельная глава «Обсуждение», краткое заключение и выводы. Объём работы типичен для кандидатских диссертаций, манускрипт состоит из 127 страниц, он содержит 29 рисунков и 11 таблиц. Список литературы включает 170 позиций.

Во введении обоснована актуальность темы диссертации; её практическая значимость и новизна; сформулированы цель и задачи исследования; приведены положения, выносимые на защиту; указаны конференции, на которых были доложены результаты работы. Во введении находится также список из трёх публикаций М. К. Живень в рецензируемых научных журналах. Надо отметить, что только в двух из них содержатся материалы данной диссертационной работы. Во введении Мария Константиновна

указывает своих коллег, которые тоже участвовали в исследовании. Согласно этим сведениям, Мария Константиновна выполнила основной массив экспериментов, включенных в данную диссертационную работу.

Обзор литературы приводит актуальные сведения по проблеме диссертационной работы, хорошо иллюстрирован и позволяет понять логику проведенных в работе экспериментов. В обзоре описано, каким образом клетка реагирует на гипоксические условия, освещена роль в адаптивной клеточной реакции факторов, индуцируемых гипоксией (HIFs). Рассмотрены ключевые регуляторные факторы, влияющие на экспрессию HIFs, а также геннотерапевтические подходы, в которых использовали HIFs или их ингибиторы. В конце обзора приведено краткое заключение, в котором суммированы положения, явившиеся предпосылкой для данной диссертационной работы.

Раздел «Материалы и методы» очень обширный и содержит 35 подразделов. Это безусловно отражает огромное разнообразие методов, использованным автором в своём исследовании: от секвенирования по Сэнгеру до геномного редактирования и эндотелиальной дифференцировки ЭСК. Нельзя не отметить, однако, что некоторые из этих подразделов можно было объединить. Например, два подраздела, посвященные заморозке и разморозке клеток, а также четыре подраздела, посвященные Вестерн-блоттингу.

Экспериментальный раздел поделён на три части. Во-первых, это получение и характеристика субклонов ЭСК с нокаутом целевого гена *EIF3E* методом CRISPR/Cas9 геномного редактирования. Во-вторых, качественная и количественная оценка эффекта моноаллельного нокаута *EIF3E* на экспрессию HIFs в ЭСК при различном содержании кислорода в среде. В-третьих, влияние моноаллельного нокаута *EIF3E* на функциональные характеристики эндотелиальных производных отредактированных субклонов ЭСК. В качестве контроля во второй и третьей части автор использует не только исходные ЭСК и ЭСК, культивируемые при пониженной концентрации кислорода, но также использует ЭСК, обработанные химическими веществами, имитирующие гипоксию *in vitro*. Это придаёт особую убедительность полученным результатам.

В обсуждении Мария Константиновна кратко обобщает полученные результаты, помещая их в контекст современных исследований, посвящённых этой тематике. Далее следует краткое заключение по работе. В конце работы сформулировано 6 довольно объёмных выводов.

## Замечания

### Замечания по существу

Нормальный физиологический уровень содержания кислорода в тканях человеческого организма находится в пределах от 3 до 7%, в среднем составляя 5%. В опухолевых тканях уровень кислорода обычно ниже и варьирует в пределах от 0.3% до 4%. Физиологически переносимый уровень гипоксии, ведущий к запуску адаптационных реакций в клетках, находится в районе 2% содержания кислорода в тканях. Уровень гипоксии, ведущей к патологическим изменениям нормальных тканей, находится в районе 1% (McKeown S. R. Defining normoxia, physoxia and hypoxia in tumours—implications for treatment response //The British journal of radiology. – 2014. – Т. 87. – №. 1035. – С. 20130676.). В своей диссертационной работе Мария Константиновна употребляет термины «нормоксия» и «гипоксия», имея в виду лабораторные условия культивирования. То есть, в диссертации гипоксическими условиями называются условия с 5% кислорода в среде, а нормоксией называются условия с 20% кислорода в среде, что соответствует содержанию кислорода в атмосфере на уровне моря. С физиологической точки зрения 5% кислорода в среде является нормоксией, а 20% кислорода в среде является гипероксигенацией. Строго говоря, гипоксические физиологические условия в данной работе протестированы не были. Надо отметить, что путаница в этом вопросе очень характерна для данной области. К сожалению, ни в обзоре, ни в обсуждении, Мария Константиновна не раскрывает своей позиции касательно терминологии, используемой для описания оксигенации.

К сожалению, автор весьма неаккуратна и неточна в деталях оформления, что мешает восприятию текста, вынуждает возвращаться в чтении назад и очень раздражает. Мелкие и очевидные оформительские ошибки перечислены в отдельном подразделе далее и не нуждаются в каких-либо комментариях от автора. Ряд ошибок, которые можно отнести к ошибкам оформления, тем не менее вызывают вопросы, на которые хотелось бы получить ответ. Так, рисунок 21 сначала вызывает недоумение из-за оформления, а потом – и по существу. При рассмотрении этого рисунка создаётся впечатление, что Мария Константиновна хаотично расставляла над столбиками гистограммы звёздочки, которыми обычно отмечают достоверные различия. Так, в рисунке 21А звёздочкой отмечено контрольное значение исходной линии ЭСК, а в рисунке 21Б звёздочками отмечены вообще все столбики. Поэтому непонятно, что означает на рисунке 21А непомеченный звёздочкой высокий столбик, обозначающий уровень экспрессии белка EIF3E у отредактированного субклона Н8. Высота этого столбика и «усы» среднеквадратичного отклонения свидетельствуют, что в этом субклоне произошло достоверное повышение экспрессии белка EIF3E после моноаллельного нокаута гена, кодирующего этот белок. Если это так, то

это удивительный факт, которому автор не уделяет никакого внимания в тексте. Тут стоит отметить, все функциональные и некоторые диагностические тесты проведены только на двух отредактированных субклонах Н9 и Е12, но не на субклоне Н8. К слову, эта избирательность путает не только читателя, но и автора. Так, подпись к рисунку 20 содержит упоминание клона Н8, которого на рисунке нет. И, наоборот, рисунок 21 содержит данные по клону Н8, но и текст, и подпись к рисунку клон Н8 не упоминают. В результате этого беспорядка не удаётся самостоятельно разобраться и необходимо спросить автора, что же в действительности произошло в результате редактирования с субклоном Н8? Всегда ли предложенная стратегия редактирования гена *EIF3E* ведёт к снижению его экспрессии?

Третье серьёзное замечание к манускрипту – это незначительность выводов, сделанных в работе. С одной стороны, можно сказать, что выводы точно соответствуют полученным результатам. С другой стороны, эти выводы слишком конкретны, они носят описательный характер, в них практически нет элементов научного обобщения. Таким образом, Мария Константиновна в аналитической части своей диссертационной работы оставила слишком многое домысливать читателю, и выводы являются откровенно слабыми.

#### Остальные замечания

Остальные замечания по оформлению и стилистике манускрипта не требуют ответа автора, являются констатацией факта и приведены в педагогических целях.

Текст манускрипта изобилует стилистическими ошибками и неточностями в выборе слов, некоторые из которых являются терминами с чёткими определениями. Примером может служить первая фраза введения (стр. 8). Так, в этой фразе автор употребляет неподходящий термин «развитие» вместо термина «эволюция» и использует тавтологичное словосочетание «регуляция гомеостатического баланса». Неудачным кажется также употребление к генному нокауту термина «сайленсинг», который обычно используется для обозначения эпигенетической регуляции, а не мутационных событий.

Автор может употребить словосочетание «более повышенные концентрации» (стр. 19); определение «недавние исследования», имея в виду написанную четверть века назад статью (стр. 32); может написать «структура доменов» вместо «доменная структура» (Рис. 1); «стандартное отклонение среднего» вместо «среднеквадратичное отклонение» (Рис. 20). Кроме того, встречаются предложения с несогласованными членами (например, стр. 26, 34).

Логика изложения внутри некоторых глав литературного обзора не выдержана. Например, первое предложение раздела 1.2 литературного обзора говорит о двух вариантах белка, HIF1A или HIF2A, каждый из которых может связаться с конститутивной

субъединицей HIF-1 $\beta$ , образуя гетеродимер. В следующем предложении появляется новый игрок – белок HIF1A, который может быть представлен уже тремя вариантами: уже упомянутыми HIF1A и HIF2A, а также HIF3A. Далее автор описывает особенности экспрессии HIF1A и HIF2A, оставляя HIF3A без какого-либо внимания. Он появляется в рисунке без каких-либо комментариев, при перечислении названий генов и внезапно — в финальной фразе раздела. Это вызывает недоумение, приходится постоянно возвращаться в чтение назад и в конечном счёте очень раздражает. Другим примером может служить раздел 1.8 литературного обзора, где автор говорит о наличии двух способов получения эндотелиальных клеток и описывает достоинства и недостатки этих методов. Далее, в конце этого раздела, оказывается, что есть и третий способ получения эндотелиальных клеток, и автор никак не указывает, как этот третий метод соотносится с первыми двумя.

Такой способ изложения вызывает у читателя посмотреть первоисточники. При этом оказывается, что список литературы тоже далеко небезупречен. Например, ссылка 48 получилась гибридной, а именно: у неоднократно процитированного автором обзора, написанного двумя японскими учеными Hashimoto & Shibasaki, неизвестным образом появилось еще 4 автора. Таким образом, нерабочими стали все 19 ссылок к обзору Hashimoto & Shibasaki, а также ссылка к той статье, авторами которой были эти присоединённые авторы. Ссылка на статью с семью авторами оформлена в тексте, как ссылка с двумя авторами (Forristal & Houghton, 2010), хотя, может быть, это просто неправильная ссылка. Ссылки на две статьи Yuan *et al.* 2014 года (стр. 46) и 2015 года (стр. 38) отсутствуют. Нет в списке статьи Gu (2018), процитированной дважды. Автор может упомянуть свои предыдущие эксперименты, как на стр. 79, и не снабдить читателя ссылкой на статью, где можно почерпнуть информацию об этих экспериментах. Автор использует при геномном редактировании плазмиду и не даёт ссылку на учёных, которые сконструировали эту плазмиду.

Неаккуратность, неточность в деталях и оформительские ошибки в некоторых случаях заставляют подозревать, что они порождены желанием автора описывать в тексте только удобные для себя экспериментальные находки, а остальные замалчивать. Например, на рисунке 23 у клона E12 отмечено звёздочкой достоверное изменение экспрессии гена *HK1*, кодирующего гексокиназу HK1, которая переключает метаболизм с аэробного дыхания на гликолиз. Это, судя по рисунку, понижение по сравнению с исходной линией ЭСК, но в тексте автор это никак не комментирует. В то же время повышение экспрессии этого гена в клоне H8 в тексте особо отмечается. Другим примером является описание в тексте результатов по анализу экспрессии генов ангиогенной дифференцировки. Автор говорит, что при обработке ЭСК миметиками гипоксии во время эндотелиальной

дифференцировки, наблюдается низкая экспрессия и даже отсутствие экспрессии гена *VEGFR2*, кодирующего рецептор к фактору роста эндотелия VEGF (стр. 91). Однако рисунок 28 и таблица 11 говорит о том, что такое наблюдается только в эндотелиальных производных одной линии HuES09, и не наблюдается в производных другой линии ESM04.

Неприятной и мешающей чтению оформительской ошибкой является то, что автор не всегда соблюдает правило, согласно которому название генов обозначается курсивом (например, стр. 26, 27, 30, 31, 58, 67, 83, 97). Латинские названия видов также следует выделять курсивом (стр. 26).

Рисунок 5, взятый из статьи Forristal et al. (2010), не переведен на русский язык. Не переведён на русский язык и рисунок 18. Для некоторых рисунков подпись не содержит информации, на что указывают стрелки, поставленные автором (Рис. 8, 10). Рисунок 29 и подписи к рисункам 14 и 28 не уместились на одной странице и «перескочили» на следующую страницу. Рисунок 25 дан в плохом разрешении, в результате подписи горизонтальной оси оказались нечитаемыми.

Часть таблиц разбиты на две страницы, при этом заглавный ряд есть только на первой из них (Таблицы 3, 4, 5, 7). Таблицы 9 и 10 не содержат информации, к какому дню дифференцировки относятся приведённые цифры.

Раздел «Материалы и методы» так же, как и вся рукопись, грешит неаккуратностью. Так, у олигонуклеотидов, служащих для создания матрицы для синтеза направляющих РНК, не указаны служебные последовательности, используемые для вставки по липким концам в плазмиду. Разделы 2.5.5, 2.5.8, 2.5.9 упоминают инструкции производителя, не указывая самого производителя. Некоторое программное обеспечение упомянуто без указания производителя, а некоторое – почему-то указано даже с адресом фирмы.

## Заключение

Имеющиеся в манускрипте недостатки не отменяют того факта, что Мария Константиновна выполнила большую и добротную экспериментальную работу, которая отличается разносторонним подходом и тщательным исполнением. Используя различные методы, включая качественные, количественные и функциональные тесты, она получила интересные результаты, достоверность которых не вызывает сомнений. Эти результаты, демонстрирующие особенности внутриклеточной регуляции при разных концентрациях кислорода, имеют как теоретическое, так и практическое значение. Выводы диссертационной работы носят описательный характер, но соответствуют полученным результатам.

Отдельно хочется отметить, что в своей диссертационной работе Мария Константиновна использовала геномное редактирование CRISPR-Cas9 в отношении к такому сложному и капризному объекту, которыми являются эмбриональные стволовые клетки человека. Мария Константиновна одной из первых в стране успешно отредактировала ЭСК таким образом, чтобы редактирование приводило к достоверному функциональному эффекту. В этом отношении её с соавторами можно назвать первопроходцами, чей путь намного сложнее, чем тех, кто идёт следом.

По результатам диссертационного исследования опубликована одна экспериментальная статья и один обзор в отечественных научных рецензируемых журналах. В обеих статьях Мария Константиновна является первым автором, что свидетельствует о её ведущем личном вкладе в эти публикации. Кроме этого, на основании данной диссертации опубликованы главы с описанием протокола геномного редактирования ИПСК в двух монографиях, посвящённых методам геномного редактирования. Эти монографии выпущены издательством Сибирского отделения РАН. Результаты диссертационной работы неоднократно доложены на конференциях и научных конгрессах, в том числе и на международных научных форумах. Написанный на основе диссертационной работы автореферат полностью отражает её основные результаты и положения.

Таким образом, диссертация Марии Константиновны Живень «Модуляция экспрессии гена HIF2A в плюрипотентных стволовых клетках человека с использованием системы CRISPR/Cas9» является законченной оригинальной работой, научное и практическое значение которой не вызывает сомнений. По своему содержанию, уровню выполнения научных исследований, научной новизне и практической значимости полученных результатов диссертация полностью отвечает требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, предъявляемым к кандидатским диссертациям; а её автор, Мария Константиновна Живень, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7 – генетика.

Отзыв на диссертационную работу Марии Константиновны Живень «Модуляция экспрессии гена HIF2A в плюрипотентных стволовых клетках человека с использованием системы CRISPR/Cas9» рассмотрен, обсужден и одобрен на заседании отдела клеточной биологии ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России 30 сентября 2021 года, протокол № 9. Результаты голосования: за – 19 голосов, против – 0 голосов, воздержавшихся – 1 голос.



Отзыв составлен 29 сентября 2021 года в.н.с. лаборатории клеточной биологии ФНКЦ ФХМ, к.б.н. (специальность 03.00.01 – радиобиология) Александрой Никитичной Богомазовой.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России), 119435, г. Москва, ул. Малая Пироговская, дом 1а, телефон: +7 (499) 246-91-65, e-mail: [gribova@rcpcm.org](mailto:gribova@rcpcm.org) (Грибова Т. Н.), [abogomazova@rcpcm.org](mailto:abogomazova@rcpcm.org) (Богомазова А. Н.). <http://rcpcm.org/>

В.н.с. лаборатории клеточной биологии  
ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России, к.б.н.  
(специальность 03.00.01 – радиобиология)

А. Н. Богомазова

Подпись заверяю:

ученый секретарь

ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России,

к.б.н



Т. Н. Грибова