



Минобрнауки России

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова»
(ФГБНУ «МГНЦ»)

УТВЕРЖДАЮ

Директор ФГБНУ «МГНЦ»,
доктор медицинских наук,
академик РАН



 Куцев С.И.

 2022 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

федерального государственного бюджетного научного учреждения
«Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова» о
научно-практической значимости диссертационной работы Зарубина
Алексея Андреевича «Экспрессия микроРНК и метилирование ДНК в
атеросклеротических бляшках сонных артерий», представленной на
соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности
1.5.7. Генетика

Актуальность темы выполненной работы

Атеросклероз – хроническое прогрессирующее воспалительное заболевание артерий, которое служит причиной развития инвалидизирующих и жизнеугрожающих осложнений – ишемии органов и острых сосудистых катастроф. Несмотря на интенсивные исследования генетических и средовых факторов, лежащих в основе развития и прогрессии атеросклеротического поражения артерий, существенная часть случаев данной патологии остается необъясненной. Не исключено, что эпигенетическая вариабельность клеток сосудов, где собственно и развиваются патологические изменения, вносит вклад в патогенез заболевания. Однако неясными являются вопросы по изменению уровня и спектра микроРНК в артериях, их связи с метилированием ДНК и генетическим

полиморфизмом, а также клеточным составом и клиническими признаками атеросклероза.

Известно, что метилирование ДНК в области генов микроРНК выше по сравнению с белок-кодирующими генами, а в некоторых регионах хромосом, обогащенных CpG-сайтами, содержится большое число микроРНК. При этом эпигеном тесно связан с геномом, поскольку генетические варианты в области CpG-сайтов изменяют профиль метилирования ДНК и связывание транскрипционных факторов, а в области генов микроРНК – их структуру или экспрессию. Это указывает на то, что использование мультиомного и интегративного подхода позволит обнаружить новые взаимосвязи между разными механизмами эпигенетической регуляции и их ассоциацию с генетическими вариантами. С другой стороны, с эпигенетическими модификациями связаны большие ожидания по идентификации терапевтических молекулярных мишеней, а также диагностических и прогностических биомаркеров в отношении осложненного течения атеросклеротического поражения артерий.

Таким образом, диссертационная работа Зарубина А.А., целью которой является выявление особенностей эпигенетических модификаций в клетках атеросклеротических бляшек сонных артерий у пациентов с клинически выраженным атеросклерозом на основе интегративного анализа экспрессии микроРНК, метилирования ДНК и генетического полиморфизма, является актуальным и востребованным исследованием.

Научная новизна работы

В результате диссертационного исследования Зарубина А.А. впервые выявлены особенности уровня и спектра микроРНК сонных артерий пациентов с клинически выраженным атеросклерозом с использованием метода секвенирования микроРНК. В рамках данной работы впервые проведен интегративный анализ метилирования ДНК и экспрессии микроРНК в атеросклеротических бляшках сонных артерий, а также результатов экзомного секвенирования лейкоцитов периферической крови, полученных от одних и тех же

пациентов. Это позволило расширить имеющиеся представления о молекулярно-генетических механизмах развития атеросклероза с точки зрения взаимодействия эпигенетических механизмов в патоморфологическом субстрате патологии – атеросклеротических бляшках. Впервые была предложена новая молекулярная классификация атеросклеротических бляшек, основанная на деконволюции клеточного состава артерий с использованием данных об уровне метилирования ДНК и экспрессии микроРНК, которая выделяет их субфенотипы в зависимости от степени лейкоцитарной инфильтрации. Впервые установлена связь аллеля С и генотипов CC+CG rs2910164 гена *MIR146A* с риском развития клинически выраженного атеросклероза сонных артерий у жителей западной Сибири славянских национальностей.

Значимость выводов и рекомендаций, полученных в диссертации, для науки и практики

Теоретическая значимость результатов исследования заключается в получении новых фундаментальных знаний о реализации эпигенетических механизмов в атеросклеротических бляшках сонных артерий, создавая более целостное представление о патогенетических процессах, происходящих на поздних стадиях заболевания. В частности, в диссертационной работе выявлены кандидатные CpG-сайты и микроРНК, которые обеспечивают взаимосвязь метилирования ДНК и экспрессии микроРНК в атеросклеротических бляшках сонных артерий, а также идентифицированы наиболее информативные, с точки зрения предсказания функциональной значимости, полиморфные варианты в генах микроРНК.

Практическая значимость работы связана с разработкой новых методов, алгоритмов и программ для интегративного и мультиомного анализа. Составлены референсные панели для деконволюции артерий на основании метилирования ДНК и экспрессии микроРНК. Предложена новая молекулярная классификация атеросклеротических бляшек, основанная на реконструкции их клеточного состава исходя из эпигенетического профиля, что позволяет учесть влияние клеточной

гетерогенности тканей в будущих исследованиях, направленных на поиск новых лекарственных мишеней и ранних маркеров заболеваний, не только для атеросклероза, но и других патологий. Разработанная программа для ЭВМ «ADAPMIR» может быть использована для более точного анализа данных секвенирования микроРНК и извлечения информации о полиморфизмах в их структуре.

Степень обоснованности научных положений и выводов, сформулированных в диссертации, их достоверность

Выбранные подходы измерения уровня метилирования ДНК, экспрессии микроРНК, генотипирования и анализа данных соответствуют уровню современной генетики и позволяют интегрировать полученные результаты с данными других исследовательских групп.

Работу отличает четкий, лаконичный и структурированный дизайн исследования, высокий методический уровень выполнения поставленных задач, полученные результаты соответствуют поставленной цели, представленные результаты приведены в полном объеме.

Объем материала, представленный в работе, на котором проведено мультиомное исследование, не очень большой, но интеграция нескольких молекулярных уровней и привлечение данных из внешних источников и баз значительно повышает достоверность представленных результатов.

Молекулярно-генетические методы включали секвенирование микроРНК, гибридизацию на биологических микрочипах, экзомное секвенирование и ПЦР-ПДРФ анализ. Биоинформатическая обработка полученных данных осуществлена с помощью широкого спектра современных методов статистического анализа, которые включают различные базы данных и пакеты специализированных программ, реализованных в среде R/Bioconductor.

По теме исследования опубликовано 23 научные работы, в том числе 5 статей в журналах, рекомендованных для публикации основных результатов кандидатских и докторских диссертаций (4 – в периодических научных журналах,

индексируемых Web of Science или Scopus), 18 тезисов, из них 5 тезисов в зарубежных медицинских журналах, а также зарегистрированы 2 программы для ЭВМ. Результаты работы представлены на всероссийских и международных конференциях.

Структура работы

Полный объём диссертационной работы Зарубина А.А составляет 124 страниц, включая 27 рисунков и 21 таблицу. Работа построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, заключения, выводов, списка литературы и 3 приложений. Библиографический указатель включает 219 источников.

В разделе **«Введение»** автором подробно изложены основные данные, которые обосновывают актуальность проведения диссертационного исследования и позволяют судить о научном заделе в данном направлении, описаны степень научной разработанности, актуальность исследования, представлены цель и задачи работы, а также новизна, теоретическая и практическая значимость. Изложена методология исследования и положения, выносимые на защиту, отображено личное участие автора, приведена информация о публикациях.

Глава **«Обзор литературы»** включает в себя подглавы. В первой подглаве описаны современные представления об атеросклерозе и его факторах риска, а во второй – его патогенез и патоморфология. С третьей по пятой подглавы подробно изложены современные представления о связи экспрессии микроРНК, метилирования ДНК и полиморфизмов генов микроРНК с развитием атеросклероза. И в последней, шестой подглаве, делается заключение по всему обзору литературы.

В главе **«Материалы и методы исследования»** приведен дизайн исследования и характеристика пациентов, а также использованные в работе молекулярно-генетические и биоинформатические методы. Описание методов

выполнено в полном объеме и является достаточным для понимания их сущности с точки зрения обоснованности подбора в соответствии с выполняемыми задачами.

В главе «**Результаты и обсуждение**» представлены результаты и их последовательное обсуждение, которые разделены на ряд подглав в соответствии с дизайном исследования, а именно: охарактеризован профиль экспрессии микроРНК в сонных артериях и проведена оценка вклада различных клеточных компонент в профиль экспрессии микроРНК методом деконволюции ткани, охарактеризован профиль метилирования ДНК и экспрессии микроРНК в атеросклеротических бляшках сонных артерий и предложена новая молекулярно-генетическая классификация атеросклеротических бляшек в зависимости от их предсказанного клеточного состава, проведен интегративный анализ экспрессии микроРНК с метилированием ДНК, выполнен поиск полиморфизма в структуре зрелой микроРНК и показана связь варианта rs2910164 (*MIR146A*) с риском развития клинически выраженного атеросклероза сонных артерий. Все полученные автором результаты диссертации представлены в таблицах и иллюстрациях, полноценно описаны и обсуждены.

В «**Заключении**» подведены основные итоги исследования, анализируются точки соприкосновения с результатами других научных коллективов, подчеркиваются особенности и достоинства данной диссертационной работы.

«**Выводы**» отражают основные результаты диссертационного исследования и полностью соответствуют поставленным задачам.

Принципиальных замечаний и вопросов по диссертационной работе не возникло.

Заключение. Высказанные замечания не умаляют значимости полученных результатов и выводов. Диссертационное исследование Зарубина Алексея Андреевича на тему «Экспрессия микроРНК и метилирование ДНК в атеросклеротических бляшках сонных артерий» является законченной, самостоятельной научно-квалификационной работой, которая содержит решение актуальной проблемы – по изучению эпигенетических механизмов в атеросклеротических бляшках сонных артерий. Результаты работы дополняют

существующие представления о молекулярных механизмах развития и течения атеросклероза, а также выявляют новые гены, сигнальные и метаболические пути, а также специфические мишени для персонализированной диагностики и лечения патологии. В исследовании представлены методы и подходы, которые могут найти своё применение при планировании и реализации других исследований.

По своей актуальности, научной новизне, практической ценности полученных результатов, методическому уровню и объему проведенных исследований представленная диссертационная работа полностью соответствует критериям, установленным пунктом 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 (с изменениями в редакции постановлений Правительства РФ от 20.03.2021 г. № 426, от 11.09.2021 г. № 1539), предъявляемых к кандидатским диссертациям, а ее автор - Зарубин Алексей Андреевич заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.7. Генетика (медицинские науки).

Отзыв на диссертационную работу Зарубина Алексея Андреевича на тему «Экспрессия микроРНК и метилирование ДНК в атеросклеротических бляшках сонных артерий» рассмотрен, обсужден и одобрен на заседании лаборатории эпигенетики ФГБНУ «МГНЦ», протокол № 1 от 31 октября 2022 г.

Кекеева Татьяна Владимировна
в.н.с. лаборатории эпигенетики ФГБНУ «МГНЦ», к.м.н.

Подпись Кекеевой Т.В. удостоверяю

Ученый секретарь ФГБНУ «МГНЦ», к.м.н.

«01» ноября 2022



Воронина Е.С.

Данные об организации: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова».

Адрес: 115522, Москва, ул. Москворечье, дом 1
Тел.: (499) 612-86-07; E-mail: mgnc@med-gen.ru