

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Зарубина Алексея Андреевича на тему «Экспрессия микроРНК и метилирование ДНК в атеросклеротических бляшках сонных артерий», представленную к защите на соискание учёной степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.7 - Генетика

Актуальность темы исследования

Атеросклероз – социально значимое заболевание, а его осложнения ведущая причина смертности и инвалидизации в мире. Факторы риска атеросклероза и его осложнения имеют существенную генетическую компоненту: их наследуемость варьирует от 20% до 90%. Однако не все случаи развития атеросклероза удается объяснить известными на настоящий момент генетическими факторами. В последнее время достаточно большое внимание уделяется изучению эпигенетических механизмов регуляции активности генов при формировании подверженности многофакторных заболеваний. Показано, что эпигеном представляет собой связующее звено между хранящейся в геноме информацией и влиянием факторов среды при формировании промежуточных и конечных патологических фенотипов сердечно-сосудистой системы, обусловленных атеросклерозом. К таким механизмам, регулирующим экспрессию генов и фенотип клеток без изменений в нуклеотидной последовательности ДНК, относят метилирование ДНК и РНК-интерференцию.

Однако результаты работ, связанных с изучением метилирования ДНК и экспрессии микроРНК в клетках атеросклеротических бляшек, плохо согласуются друг с другом. В частности, спектр дифференциально метилированных CpG-сайтов и микроРНК, различается между исследованиями. Среди основных причин могут быть разные методы, исследование артерий разной локализации и с разной стадией патологического процесса, этнические особенности индивидов и влияние факторов среды, а также различие в клеточном составе изучаемых образцов. В связи с этим, актуальным является анализ профилей метилирования ДНК и экспрессии микроРНК в определенных артериях, а также оценка их связи с клеточным составом и клиническими признаками атеросклероза.

Работы, использующие интегративный подход для изучения связи экспрессии микроРНК, метилирования ДНК и генетического полиморфизма в области генов микроРНК одновременно в одной и той же атеросклеротической бляшке у человека *in vivo*, ранее не проводились. Поскольку эти механизмы могут взаимно дополнять друг друга, обеспечивая функционирование обратной связи, это представляется актуальным и может позволить обнаружить новые патогенетически значимые механизмы развития атеросклероза.

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

Диссертационная работа Зарубина А.А. проведена на достаточно высоком методическом уровне. В ходе работы были сформулированы научные положения и выводы, с применением современных методов молекулярно-генетического исследования (секвенирования микроРНК, метилочипов, экзомного секвенирование), а также с привлечением большого количества данных из открытых источников и баз (FANTOM5, miRTarBase, HMDD, gnomAD, GEO). Был проведён тщательный статистический и биоинформатический анализ с использованием релевантных методов математической статистики и биоинформатики при соблюдении необходимых требований к условиям их применения. Достоверность результатов работы сомнений не вызывает.

Научная новизна исследования

В результате данной исследовательской работы впервые охарактеризован уровень экспрессии и спектр микроРНК в атеросклеротически поражённых и интактных сонных артериях у пациентов с клинически выраженным атеросклерозом с помощью микроРНК секвенирования. Выделены субфенотипы атеросклеротических бляшек в зависимости от степени лейкоцитарной инфильтрации. Между данными субфенотипами атеросклеротических бляшек сонных артерий обнаружены существенные различия по спектру как метилированных CpG-сайтов, так и экспрессированных микроРНК. Впервые в настоящем исследовании проведен интегративный анализ профилей метилирования ДНК и экспрессии микроРНК в клетках атеросклеротических бляшек сонных артерий и экзоминого секвенирования лейкоцитов периферической крови, полученных от одних и тех же пациентов с клинически выраженным атеросклерозом. Выявлены кандидатные CpG-сайты и микроРНК, которые обеспечивают взаимосвязь метилирования ДНК и экспрессии микроРНК в атеросклеротических бляшках сонных артерий. Впервые охарактеризован спектр функционально значимых полиморфных вариантов в структуре зрелых микроРНК в лейкоцитах крови у пациентов с выраженным атеросклерозом сонных артерий в атеросклеротических бляшках. Установлена ассоциация аллеля С и генотипов CC+CG rs2910164 гена *MIR146A* с риском развития атеросклероза сонных артерий у жителей западной Сибири славянских национальностей.

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

Полученные в ходе выполнения настоящего диссертационного исследования новые знания расширяют представление о спектре экспрессируемых в атеросклеротических бляшках микроРНК, полиморфных вариантах в их структуре, а также их связи с метилированием ДНК и клеточным составом. Сформированные в результате исследования списки дифференциально-экспрессированных микроРНК и дифференциально-метилированных CpG-сайтов между интактными сонными артериями и атеросклеротическими бляшками с высокой и низкой лейкоцитарной инфильтрацией представляют интерес для дальнейшего изучения на предмет выделения потенциальных биомаркёров и мишеней для лечения атеросклероза сонных артерий.

Разработанные подходы для деконволюции клеточного состава артериальной стенки с использованием данных об уровне метилирования ДНК и экспрессии микроРНК могут быть адаптированы для применения в исследованиях, особенно в случае высокой клеточной гетерогенности образцов тканей. Созданный алгоритм для обработки данных микроРНК секвенирования с последующим точным извлечением информации о полиморфизмах в их структуре, может быть использован для получения нового уровня данных при проведении экспериментов по секвенированию микроРНК.

Материалы данного исследования могут использоваться в учебном процессе студентов медико-биологических направлений подготовки.

Структура и содержание диссертационной 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» описаны степень научной разработанности, новизна, теоретическая и практическая значимость, а также актуальность исследования, представлены цель и задачи работы. Изложена методология исследования и положения, выносимые на защиту, и отображено личное участие автора, приведена информация о публикациях.

В главе «Обзор литературы» описаны современные представления о патогенезе атеросклероза, связь эпигенетических механизмов регуляции (метилирование ДНК и экспрессия микроРНК) и генетического полиморфизма с развитием атеросклероза.

В главе «Материалы и методы исследования» приведены дизайн исследования и подробная характеристика пациентов. В данной главе также подробно описаны использованные в работе молекулярно-генетические и биоинформатические методы.

Глава «Результаты и обсуждение» включает пять подглав. В первой подглаве охарактеризован профиль экспрессии микроРНК в сонных артериях, в том числе выделены микроРНК, чья экспрессия изменена в поражённой атеросклерозом сонной артерии. Проведена оценка вклада различных клеточных компонент в профиль экспрессии микроРНК методом деконволюции ткани. Описаны модули коэкспрессии микроРНК и их связь с клеточным составом.

Во второй подглаве охарактеризован профиль метилирования ДНК в атеросклеротических бляшках сонных артерий и введена новая молекулярно-генетическая классификация атеросклеротических бляшек в зависимости от предсказанного клеточного состава.

В третьей подглаве для тех же образцов описывается профиль экспрессии микроРНК и уточняется его связь с клеточным составом.

В четвёртой подглаве проводится интегративный анализ экспрессии микроРНК с метилированием ДНК и демонстрируются примеры, как эпигенетические модификации могут влиять друг на друга.

В последней части главы проведена идентификация полиморфизма в структуре зрелой микроРНК в атеросклеротических бляшках сонных артерий у пациентов с клинически выраженным атеросклерозом. Показана связь варианта rs2910164 (*MIR146A*) с риском развития клинически выраженного атеросклероза.

Значительный интерес в работе представляют новые данные об эпигенетических изменениях, происходящих в атеросклеротической бляшке, их связи между собой и структурными вариантами. В диссертационной работе анализируются различные уровни молекулярной информации и выполнен их интегративный анализ, что позволяет говорить о ней как о мультиомном исследовании.

Все полученные автором результаты диссертации представлены в таблицах и иллюстрациях, полноценно описаны и обсуждены.

В «Заключении» автор в краткой форме подводит итог всех исследований и резюмирует ключевые положения диссертационной работы. Выводы диссертационного исследования четко сформулированы и соответствуют поставленным целям и задачам.

Сведения о полноте опубликованных научных работ

По теме исследования опубликовано в соавторстве 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, зарегистрированы 2 программы для ЭВМ.

Соответствие автореферата основным положениям диссертации

Автореферат диссертации Зарубина Алексея Андреевича полностью соответствует основным положениям диссертации. В автореферате отражены актуальность исследования, степень разработанности темы, цель и задачи, научная новизна, теоретическая и практическая значимость исследования, основные положения, выносимые на защиту, полученные результаты; приведены обобщающее заключение и выводы.

Общие вопросы и замечания по работе

1. Проводился ли лабораторный контроль качества генотипирования rs2910164 гена *MIR146A*?

2. В работе детально описана методика генотипирования rs2910164 гена *MIR146A* но не приводятся методы, которые применялись для анализа ассоциаций этого полиморфизма с атеросклерозом сонных артерий, почему?

3. Использовались ли при анализе ассоциаций rs2910164 гена *MIR146A* с атеросклерозом сонных артерий какие-либо ковариаты, так как очевидны различия анализируемых групп больных и контроля по полу?

4. Какое практическое значение могут иметь полученные в работе данные, планируется ли их внедрение в практическую медицину?

Приведенные замечания и вопросы не влияют на общее благоприятное впечатление от диссертационной работы А.А. Зарубина.

Заключение

Диссертационная работа Зарубина Алексея Андреевича на тему «Экспрессия микроРНК и метилирование ДНК в атеросклеротических бляшках сонных артерий» является законченной научно-квалификационной работой, в которой решена актуальная научно-практическая задача по выявлению особенностей эпигенетических модификаций в клетках атеросклеротических бляшек сонных артерий и интеграции данных изменения уровня микроРНК, метилирования ДНК и генетического полиморфизма, что имеет существенное значение для формирования фундаментальных знаний о прогрессии атеросклеротического поражения сосудов у человека.

Диссертационная работа полностью соответствует требованиям п. 9-14, установленным «Положением о порядке присуждения ученых степеней», утвержденным постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09. 2013 г. 842 (в редакции с изменениями и дополнениями от 30 июля 2014 г., 21 апреля, 2 августа 2016 г., 29 мая, 28 августа 2017 г., 1 октября 2018 г., 20 марта, 11 сентября 2021 г.), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присвоения степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.7 — Генетика.

Официальный оппонент:

Заведующий кафедрой медико-биологических дисциплин медицинского института ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет»

Министерства науки и высшего образования РФ

Заслуженный работник высшей школы РФ

Доктор медицинских наук

(шифр специальности 1.5.7. - Генетика)

Профессор

Чурносов Михаил Иванович

Контактные данные:

Адрес: 308015 г.Белгород ул.Победы д.85

Телефон: 4722 301383

E-mail: churnosov@bsu.edu.ru

Личную подпись удостоверяю Ведущий специалист по кадрам управления по развитию персонала и кадровой работе	Чурносова М.И.
	Или Инициалы ИИ
	«24» 10 2022 г.

