

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

кандидата медицинских наук Шахтшнейдер Елены Владимировны
на диссертационную работу Зарубина Алексея Андреевича
«Экспрессия микроРНК и метилирование ДНК в атеросклеротических бляшках
сонных артерий», представленную на соискание ученой степени кандидата
медицинских наук по специальности 1.5.7. Генетика

Актуальность темы диссертационной работы

Диссертация Алексея Андреевича Зарубина посвящена изучению особенностей эпигенетических модификаций в клетках атеросклеротических бляшек сонных артерий с использованием анализа профилей метилирования ДНК, экспрессии микроРНК и генетического полиморфизма. Клинические проявления атеросклероза – многофакторного процесса, существенный вклад в развитие которого вносят генетические компоненты – зависят от локализации и степени атеросклеротического поражения артерий. Наиболее распространенными являются атеросклеротические изменения в коронарных и сонных артериях. В настоящее время большое внимание уделяется изучению эпигенетических механизмов регуляции активности генов в атеросклеротических бляшках. Эпигеном тесно связан с геномом в связи с тем, что генетические варианты в области CpG-сайтов изменяют профиль метилирования ДНК и связывание транскрипционных факторов, а в области генов микроРНК – их структуру или экспрессию. МикроРНК могут быть мишенями для эпигенетических модификаций, когда в области промоторов генов микроРНК изменяется уровень метилирования ДНК, что приводит к изменению их экспрессии. В свою очередь микроРНК способны изменять уровень метилирования ДНК, регулируя ДНК-метилтрансферазу или метил-ДНК связывающие белки.

В контексте анализа молекулярных данных и их ассоциации с патогенетически значимыми признаками атеросклероза, профили метилирования ДНК и экспрессии микроРНК могут быть информативны для молекулярной классификации образцов атеросклеротических бляшек. Комплексный подход к изучению механизмов регуляции активности генов в

атеросклеротических бляшках сонных артерий дополняет существующие представления о патогенезе заболевания, а также генерирует новые знания, в том числе возможность определения терапевтических молекулярных мишеней для персонализированной медицины.

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

Обоснованность и достоверность научных положений и выводов диссертации базируется на применении в работе современных методов молекулярно-генетических исследований и использовании релевантных подходов математической статистики и биоинформатики.

Исследование выполнено на выборке пациентов НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний (г. Кемерово) и НИИ кардиологии Томского НИМЦ (г. Томск). В ходе выполнения диссертационной работы применены методы клинического и инструментального обследования пациентов, всем пациентам, при наличии показаний, проведена каротидная эндартерэктомия и гистологический анализ тканей артерий. Использование автором комплекса методов молекулярно-генетического анализа для каждого пациента, включая секвенирование микроРНК, гибридизацию на биологических микрочипах, экзомное секвенирование и ПЦР-ПДРФ анализ, позволяет исключить межиндивидуальные различия.

В работе четко сформулированы положения, выносимые на защиту. Результаты исследования изложены достаточно полно и информативно. Выводы отвечают цели и задачам исследования. Все основные результаты исследования опубликованы в реферируемых журналах.

**Новизна научных положений, выводов и рекомендаций,
сформулированных в диссертации**

Автором впервые изучен уровень экспрессии и спектр микроРНК в атеросклеротически поражённых и интактных частях сонных артерий у пациентов с клинически выраженным атеросклерозом с помощью микроРНК секвенирования.

В работе показаны субфенотипы атеросклеротических бляшек в зависимости от степени лейкоцитарной инфильтрации с использованием данных об уровне метилирования ДНК и экспрессии микроРНК. Автором впервые в настоящем исследовании проведен комплексный анализ профилей метилирования ДНК и экспрессии микроРНК в клетках атеросклеротических бляшек сонных артерий и экзомного секвенирования лейкоцитов периферической крови, полученных от одних и тех же пациентов с атеросклерозом. Выявлены кандидатные CpG-сайты и микроРНК, которые обеспечивают ассоциацию метилирования ДНК и экспрессии микроРНК в атеросклеротических бляшках сонных артерий.

Автором впервые охарактеризован спектр функционально значимых полиморфных вариантов в структуре зрелых микроРНК у пациентов с выраженным атеросклерозом сонных артерий. В результате настоящего исследования впервые установлена ассоциация полиморфного варианта rs2910164 гена MIR146A с риском развития атеросклероза сонных артерий у славян жителей западной Сибири.

В результате исследования автором был разработан алгоритм для качественной подготовки данных микроРНК секвенирования, позволяющий более точно удалять последовательности адаптера, фильтровать данные от некачественных прочтений и проводить подсчёт уровня экспрессии микроРНК.

Полученные в ходе выполнения настоящего исследования новые знания расширяют представление о спектре экспрессируемых в атеросклеротических бляшках микроРНК, полиморфных вариантах в их структуре, а также их ассоциации с метилированием ДНК и клеточным составом. В целом, полученные результаты имеют несомненную научную новизну.

Полнота изложения основных результатов исследования в диссертации и научной печати

Основные результаты исследования по теме диссертационной работы представлены и обсуждены на российских и международных конференциях и конгрессах. По теме диссертационной работы опубликовано 5 статей,

отражающих основные результаты диссертации, в рецензируемых журналах, рекомендованных Перечнем ВАК Российской Федерации. Статьи опубликованы в журналах, соответствующих заявленной специальности.

Оценка содержания диссертации

Диссертационная работа Зарубина Алексея Андреевича построена по классической форме и содержит введение, 3 главы, заключение, и 3 приложения. Материалы диссертации представлены на 124 страницах машинописного текста. Прилагаемая библиография содержит ссылки на 219 источников. Работа иллюстрирована 18 таблицами и 27 рисунками.

Введение содержит информацию об актуальности исследования, целях и задачах. Приводятся данные о научной новизне, теоретической значимости, личном вкладе автора. Представлены положения, выносимые на защиту.

В первой главе, посвященной обзору литературы, представлен анализ отечественных и зарубежных литературных источников по теме исследования. В обзоре приводится определение и факторы риска атеросклероза, раскрывается роль эпигенома в поддержании и модификации фенотипа клеток. Автором отмечается многокомпонентность процесса атерогенеза, включающего в себя различные изменения на уровне отдельных клеток и молекул. Подчеркивается, что данные изменения сопряжены с регуляцией функциональной активности многих генов в клетках, которая осуществляется с помощью эпигенетических механизмов, в том числе РНК-интерференции через молекулы некодирующих РНК. Подробно описаны результаты предшествующих научных исследований в области экспрессии микроРНК, метилирования ДНК и полиморфизма генов микроРНК при атеросклерозе. Автором отмечены определённые недостатки в применявшихся ранее методических подходах анализа экспрессии микроРНК с помощью микрочипов и ПЦР в режиме реального времени. В литературном обзоре также описаны отличия в уровне и рисунке метилирования ДНК в клетках сосудов различной локализации. Литературный обзор отражает современное состояние проблемы

изучения эпигенетических модификаций и завершается аргументированным заключением.

В главе «Материалы и методы» подробно представлены технологии молекулярно-генетических исследований. Приводится клиническая характеристика пациентов. Дизайн исследования представлен в виде наглядной схемы.

Глава 3 отражает полученные диссертантом результаты исследования. Автором представлены результаты анализа экспрессии микроРНК в сонных артериях, приведена характеристика спектра дифференциально-экспрессирующихся микроРНК между клетками атеросклеротических бляшек и подлежащих интактных частей сонных артерий. В результате использования разработанного алгоритма деконволюции клеточного состава сонных артерий на основании профиля экспрессии микроРНК, представлены различия в клеточном составе атеросклеротических бляшек и интактных частей сонных артерий. Во втором разделе Главы 3 показаны результаты оценки профиля метилирования ДНК в клетках атеросклеротических бляшек сонных артерий. Показана ассоциация паттерна метилирования ДНК в атеросклеротических бляшках сонных артерий с их клеточным составом. Следующий раздел Главы 3 посвящен результатам оценки экспрессии микроРНК в атеросклеротических бляшках: идентифицировано 18 дифференциально-экспрессированных микроРНК между относительно интактными сонными артериями и атеросклеротическими бляшками с высокой и низкой лейкоцитарной инфильтрацией. В четвертом разделе Главы 3 представлены данные о наличии ряда ассоциаций метилирования ДНК и экспрессии микроРНК в атеросклеротических бляшках сонных артерий. Заключительный раздел содержит результаты идентификации полиморфизма в структуре зрелой микроРНК в атеросклеротических бляшках сонных артерий у пациентов с клинически выраженным атеросклерозом. Каждый раздел главы наглядно иллюстрирован. При обсуждении собственных результатов автор проводит сравнение с ранее полученными данными по рассматриваемой тематике в

отечественной и зарубежной литературе. Результаты проведенного исследования расширяют имеющиеся представления о молекулярных механизмах атеросклероза, дополняя их новыми эпигенетическими компонентами и их ассоциациями.

Заключение содержит основные итоги проведенного исследования. Завершают диссертацию выводы, основанные на результатах исследования.

Практическая значимость полученных результатов исследования

Разработанный автором оригинальный подход для оценки молекулярных параметров атеросклеротических бляшек может быть использован для обработки и анализа больших данных в контексте развития атеросклеротического процесса. Алгоритм для подготовки данных микроРНК секвенирования (AdaptMIR), предложенный автором, может быть широко использован для более качественного извлечения информации о генотипах из данных микроРНК секвенирования в исследовательских лабораториях.

Принципиальных замечаний по работе нет. В рамках дискуссии хотелось бы обсудить следующие вопросы:

1. Каким слоем стенки сосудов была представлена интактная часть сонных артерий, анализируемая в работе? Проводилось ли сравнение профиля экспрессии микроРНК между гистологически интактными частями сонной артерии обследованных пациентов с атеросклерозом и аналогичными слоями сосудистой стенки сонных артерий у здоровых лиц, в том числе с использованием внешних общедоступных баз данных?
2. Какие из 77 микроРНК, для которых ассоциация с атеросклерозом была установлена впервые в вашем исследовании, представляются перспективными в качестве потенциальных биомаркеров нестабильности атеросклеротических бляшек?

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Зарубина Алексея Андреевича «Экспрессия микроРНК и метилирование ДНК в атеросклеротических бляшках сонных артерий», представленная к защите на соискание ученой степени кандидата

медицинских наук по специальности 1.5.7. Генетика, является завершенной научно-квалификационной работой, выполненной под руководством д.м.н., профессора Назаренко М.С., в которой содержится решение научной задачи по изучению особенностей эпигенетических модификаций в клетках атеросклеротических бляшек сонных артерий с использованием анализа профилей метилирования ДНК, экспрессии микроРНК и генетического полиморфизма.

По своей актуальности, научной новизне, степени обоснованности сформулированных в диссертации научных положений и выводов, значимости полученных результатов, представленная работа соответствует требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842 (в редакции с изменениями, утвержденными Постановлением Правительства Российской Федерации от 11.09.2021 №1539), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор, Зарубин Алексей Андреевич, заслуживает присуждения искомой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.7. Генетика.

Официальный оппонент:

Ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярно-генетических исследований терапевтических заболеваний Научно-исследовательского института терапии и профилактической медицины – филиала ИЦиГ СО РАН, к.м.н., (3.1.18. Внутренние болезни, 1.5.7. Генетика)



Елена Владимировна Шахтшнейдер

Подпись к.м.н., в.н.с. Шахтшнейдер Е.В. заверяю.

Ученый секретарь Научно-исследовательского института терапии и профилактической медицины – филиала ИЦиГ СО РАН,

к.м.н.

Татьяна Ивановна Романова

« 10 » ноября 2022 г.



Контактная информация:

Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины - филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения "Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук" (НИИТПМ - филиал ИЦиГ СО РАН), 630089, г. Новосибирск, ул. Бориса Богаткова, д. 175/1; тел. +7 (383) 373-09-81, +7 (383) 264-25-16; niitpm.office@gmail.com; <http://www.iimed.ru>