

## **ОТЗЫВ**

официального оппонента доктора биологических наук, профессора Даниленко Валерия Николаевича на диссертацию Сазоновой Маргариты Александровны на тему: «Связь мутаций митохондриального генома с формированием атеросклеротических поражений артериальной стенки», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика

### **Актуальность темы диссертации**

Основной причиной смертности от сердечно-сосудистых заболеваний, зачастую, является артериальный атеросклероз, при котором развиваются дегенеративные изменения в интиме магистральных сосудов. Следствием этих изменений является сужение просвета артерий и как следствие уменьшение кровоснабжения органов человека. В последнее время возникновение и развитие атеросклероза приобрело характер эпидемии. Этиология, причины, приводящие к этому мало исследованы. Поэтому изучение причин, механизмов и диагностирования данного заболевания представляется весьма актуальным и своевременным. При этом атеросклероз трудно распознать с помощью клинических методов в начальных стадиях заболевания. Молекулярные маркеры, ассоциированные с данной патологией, могли бы помочь в ее ранней диагностике. Следует отметить, что в исследовательских работах ученых всего мира, анализируются, в основном, мутации ядерного генома, ассоциированные с атеросклеротическими поражениями. В связи с этим особенно актуальным представляется исследование при атеросклеротических поражениях точечных мутаций, микроделеций и микроинсерций, локализованных в митохондриальных генах.

## **Достоверность и новизна научных положений, выводов и рекомендаций**

В своей работе Сазонова Маргарита Александровна использовала самые современные методы исследования. Новизна диссертации состоит в том, что автор, совместно с сотрудниками своей лаборатории, разработал оригинальный метод количественной оценки мутантного аллеля митохондриального генома. Этот метод был разработан на базе технологии пиросеквенирования и дал возможность анализировать уровень гетероплазии мутаций митохондриального генома в коротких фрагментах ДНК (5-10 пар нуклеотидов), определяя предрасположенность к возникновению и развитию атеросклеротических поражений на основании порогового уровня гетероплазии мутаций мтДНК. Работа выполнена на высоком научном и методическом уровне. Исследовано большое количество клинического материала. Диссертантом были обнаружены три новые мутации митохондриального генома m.652delG, m.961delC и m.5132insAA, которые ранее не были описаны в литературе. Кроме того, автор провел исследование уровня гетероплазии митохондриальных мутаций в участках морфологически картированной интимы аорты человека. При этом были выявлены мутации, характерные для разных типов атеросклеротического поражения, а также суммарного атеросклеротического поражения. Обнаружены мутации мтДНК в клетках крови, ассоциированные с наличием атеросклеротических бляшек или утолщением интимо-медиального слоя сонных артерий. Выявлены митохондриальные гаплотипы и гаплогруппы, связанные с атеросклерозом. Высокая значимость результатов исследования подтверждена самыми современными статистическими программами. Практические рекомендации по

использованию результатов исследования врачами-генетиками и практическими врачами достоверны и обладают высокой степенью новизны.

Новизна и достоверность диссертационной работы подтверждена двумя патентными заявками: от 10.08.2010 «Способ генетической диагностики предрасположенности к атеросклерозу» (регистрационный №2010133468) и от 09.10.2012 «Способ генодиагностики сердечно-сосудистых заболеваний» (регистрационный № 2012142947).

### **Степень обоснованности научных положений, выводов и практических рекомендаций диссертации**

Обоснованность научных положений, выводов и практических рекомендаций диссертации Сазоновой М.А не вызывает сомнений. В доказательство этого автор приводит достаточно убедительные аргументы. В частности, Сазонова М.А. доказала, что метод количественной оценки уровня гетероплазмии мутаций митохондриального генома – это обоснованный метод выявления предрасположенности индивидов к атеросклерозу. Алгоритм оценки такой предрасположенности, включающий анализ уровня гетероплазмии 11 мутаций мтДНК и детекцию трех митохондриальных гаплогрупп имеет высокую степень обоснованности для исследования пациентов.

Научные положения, выводы и практические рекомендации диссертационной работы обоснованы, имеют научное и практическое значение. Обоснованность их подтверждается использованием большого количества клинического материала для исследования.

Практические рекомендации диссертации могут быть использованы медицинскими генетиками, учеными и практическими врачами. Результаты исследования Сазоновой М.А. можно использовать в учебном процессе на

кафедрах медицинской генетики, фундаментальной медицины, в институтах усовершенствования врачей, а также при обучении аспирантов в научно-исследовательских институтах, специализирующихся на изучении атеросклероза, сосудистых и сердечно-сосудистых заболеваний.

Основные положения диссертации доложены на 28 российских и зарубежных конференциях и конгрессах, а также опубликованы в их материалах.

По теме диссертации опубликована 91 научная работа, в том числе в ведущих рецензируемых научных журналах, входящих в список ВАК Российской Федерации и журналах, индексируемых Web of Science и Scopus. По результатам диссертационной работы опубликована монография.

По своему содержанию автореферат и публикации автора полностью соответствует названию диссертационной работы.

Индекс Хирша Сазоновой М.А. составляет 7,0 по базе «Scopus» и 9,0 по базе РИНЦ.

### **Содержание и структура диссертационной работы**

Диссертант логично построил диссертационную работу, четко ее структурировал и дополнил достаточным количеством рисунков и таблиц, которые облегчают восприятие диссертации.

350 страниц машинописного текста диссертации содержат введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, 11 глав собственных результатов исследований, обсуждение полученных результатов, заключение, практические рекомендации, выводы. Список литературы включает 615 источников. Из них 130 источников цитируют российские публикации, и 485 источников – зарубежные публикации. Хорошее впечатление

от диссертации дополняет то, что автор цитирует не только современных исследователей, но и основоположников, занимавшихся проблемой атеросклероза – Анничкова Н.Н., Мясникова А.Л., Вихерта А.М., Жданова В.С., Нагорнева В.А., Ланкина В.З., Чазова Е.И. и т.д. Работа иллюстрирована 80 таблицами и 51 рисунком.

Диссертационная работа Сазоновой М.А. в полной мере соответствует требованиям ВАК, предъявляемым к структуре докторских диссертаций по оформлению, изложению материала, объему и построению.

В разделе «Введение» обосновывается актуальность изучаемой проблемы. Рассматриваются основные положения диссертации, в которых аргументируется необходимость использования генетического метода, разработанного диссертантом, для прогноза возникновения и развития атеросклероза у пациентов. Сформулированы адекватные цель и задачи работы, соответствующие тематике и направленности диссертации.

В главе «Обзор литературы» рассматриваются медицинские и социальные аспекты атеросклероза, обосновывается важность выявления молекулярно-генетических маркеров - предикторов атеросклеротических поражений, освещаются современные представления о патогенетических механизмах атеросклероза. Кроме того, диссертант анализирует факторы риска и гипотезы возникновения атеросклероза, а также роль эндотелиальных клеток, моноцитов-макрофагов и гладкомышечных клеток в атерогенезе. Исходя из данных литературы, автор устанавливает, что большинство молекулярно-генетических исследований посвящено поиску ядерных мутаций и полиморфизмов, ассоциированных с атеросклеротическими поражениями, которые имеют достаточно низкую диагностическую и прогностическую значимость при



атеросклерозе. В то же время поиск мутаций в митохондриальном геноме при атеросклерозе, как оказалось, проводился, главным образом, на уровне крупных делеций, следствием которых могла быть только полная дисфункция митохондриального генома. Сазонова М.А. доказывает целесообразность проведения исследований точечных мутаций, микроделеций и микроинсерций митохондриального генома с целью выявления молекулярно-генетических маркеров атеросклероза.

Во главе «Материалы и методы» автор характеризует объекты исследования, включающие образцы нормальной интимы и участки с различными типами атеросклеротических поражений интимы аорты, а также лейкоциты крови. Раздел, посвященный методике пиросеквенирования, написан достаточно подробно и позволит другим исследователям воспроизвести ее. Другие современные методы, использованные диссертантом, также описаны подробно и могут быть воспроизведены другими учеными. К ним относятся методы ультразвукового сканирования сонных артерий, выделения ДНК, гель-электрофореза, полимеразной цепной реакции, трансмиссионной электронной микроскопии и другие.

В главе «Результаты», состоящей из 11 разделов, девять разделов посвящены собственным исследованиям и два раздела - совместным исследованиям с лабораторией популяционной генетики Медико-генетического центра. В первом разделе представлен сравнительный электронно-микроскопический анализ митохондрий клеток интимы в нормальных и пораженных атеросклерозом участках стенки сосудов. Согласно данным автора, количество митохондрий со структурными изменениями в атеросклеротических бляшках оказалось значительно выше, чем в нормальной интиме. Второй раздел

посвящен описанию созданного Сазоновой М.А. с коллегами нового оригинального метода количественной оценки мутантного аллеля митохондриального генома, разработанного на базе технологии пиросеквенирования коротких фрагментов ДНК. Описаны способы определения процента гетероплазии мутаций митохондриального генома. Приведены примеры гистограмм и уровня гетероплазии мутаций, рассчитанного по пириграммам ПЦР-фрагментов образцов ДНК для некоторых мутаций. Третий раздел главы «Результаты» посвящен исследованию интимы аорты человека с помощью метода количественной оценки мутантного аллеля митохондриального генома, в частности, определению уровня гетероплазии 42 мутаций митохондриального генома в липофильных бляшках и нормальной интиме аорты. На основании пилотных результаты данного исследования Сазонова М.А. приводит убедительные аргументы о необходимости дальнейшего исследования 11 мутаций митохондриального генома на образцах интимы аорты и клеток крови пораженных атеросклерозом индивидов.

Вначале выявленные 11 мутаций были исследованы в более многочисленной выборке участков нормальной и пораженной атеросклерозом интимы аорты индивидов. Всего было исследовано 265 образцов. Это исследование является новаторским, т.к. оно было выполнено с использованием, в качестве объекта исследования, предварительно морфологически картированной сосудистой стенки нескольких аорт. Каждая аорта была разделена на участки интимы, имеющие атеросклеротические поражения определенной степени тяжести: начальное атеросклеротическое поражение, жировую полосу, липофиброзную бляшку, фиброзную бляшку и участки нормальной интимы. Из каждого участка была выделена ДНК и проведен анализ уровня гетероплазии 11 мутаций митохондриального генома.

Сазонова М.А. обнаружила, что для различных типов атеросклеротического поражения интимы аорт характерен свой набор мутаций, связанных с атеросклеротическим поражением определенного типа.

Затем был проведен анализ уровня гетероплазмии в клетках крови 700 участников исследования. Диссертантом была выявлена связь уровня гетероплазмии мутаций митохондриального генома клеток крови с наличием атеросклеротических бляшек и утолщением интимо-медиального слоя сонных артерий. Сазонова М.А. установила, что совокупная мутационная нагрузка 11 исследованных мутаций митохондриального генома клеток крови ассоциирована более, чем с 84% атеросклеротических бляшек и случаев утолщения интимо-медиального слоя сонных артерий человека. Были обнаружены два гаплотипа митохондриального генома, связанные с атеросклерозом, которые состояли из исследованных мутаций. Кроме того, были выявлены три гаплогруппы митохондриального генома, одна из которых (гаплогруппа U) связана с возникновением и развитием атеросклероза, а две гаплогруппы (M и T) – имеют защитный эффект при атеросклеротических поражениях.

Глава «Обсуждение» написана в соответствии с требованиями, предъявляемыми ВАК. В ней проводится глубокий анализ литературных данных и полученных результатов, сравнивается разработанный диссертантом с коллегами оригинальный метод количественной оценки мутантного аллеля митохондриального генома, разработанный на базе технологии пиросеквенирования коротких фрагментов ДНК, с другими количественными методами анализа мутаций в ДНК. Автор приводит патогенетические связи между выявленными мутациями мтДНК со структурными изменениями в митохондриальных молекулах РНК и белков, которые могут привести к



дисфункции митохондрий. Также диссертант рассматривает возможные защитные механизмы выявленных мутаций митохондриального генома, для которых обнаружена связь с отсутствием атеросклеротических поражений у участников исследования.

В последние годы появляется все больше исследований посвященных, связи состояния микробиоты желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) и различных заболеваний в том числе кардиологических. Поэтому на будущее представляется перспективным наряду с разработанными диссертантом подходами для ранней диагностики атеросклероза учитывать и биомаркеры микробиоты ЖКТ.

Диссертационную работу завершают краткое заключение, выводы и список использованной Сазоновой М.А. литературы.

Личный вклад автора диссертации в исследование составляет более 90%.

Выводы отражают основные результаты проведенных исследований и соответствуют поставленным задачам.

Содержание автореферата соответствует содержанию диссертации.

### **Заключение**

Таким образом, диссертация М.А. Сазоновой является законченным трудом, в котором на основании выполненных автором исследований и разработок осуществлено решение научной проблемы связи мутаций митохондриального генома с формированием атеросклеротических поражений артериальной стенки, имеющей важное значение для генетики.

По своей актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости, достоверности полученных результатов и обоснованности выводов представленная работа соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 г. (с изменениями в редакции постановлений Правительства Российской Федерации № 335 от 21.04.2016 г., № 748 от 02.08.2016 г.), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора биологических наук, а её автор - Сазонова Маргарита Александровна достойна присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.07 - генетика.

Заведующий отделом генетических основ  
биотехнологии Федерального государственного  
бюджетного учреждения науки «Институт общей  
генетики имени Н.И. Вавилова» Российской  
академии наук,

Доктор биологических наук,

профессор

03.02.07 - генетика

 Даниленко Валерий Николаевич  
18.03.2019г.

Подпись руки Даниленко В.Н. заверяю,

Ученый секретарь Федерального государственного  
бюджетного учреждения науки

«Института общей генетики имени Н.И. Вавилова»

Российской академии наук, д.б.н., профессор

  Абилев С.К.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт общей генетики имени Н.И.Вавилова» Российской академии наук, почтовый адрес: 119991, г.Москва, ул. Губкина, д.3, телефон +74991353056, +79037965463, e-mail: valerid@vigg.ru