

## **ОТЗЫВ**

официального оппонента доктора биологических наук, доцента Машкиной Елены Владимировны 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**

В настоящее время наибольшее влияние на здоровье человека оказывают социально значимые полигенные мультифакториальные заболевания, такие как атеросклероз, диабет, рак. Следует отметить, что одной из основных причин смертности от сердечно-сосудистых заболеваний является артериальный атеросклероз, при котором развиваются дегенеративные изменения в интиме магистральных сосудов. Однако начальные стадии атеросклероза трудно распознать с помощью клинических методов исследования. Молекулярно-генетические маркеры, ассоциированные с атеросклерозом, могли бы помочь в его ранней диагностике. Поэтому диссертационная работа Сазоновой Маргариты Александровны, посвященная выявлению связи митохондриального генома с формированием атеросклеротических поражений артериальной стенки, несомненно является актуальным исследованием.

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

Научная новизна данной работы обусловлена тем, что при изучении ассоциации митохондриальных мутаций с заболеваниями людей была

использована не только качественная, но и количественная оценка частот мутантного аллеля митохондриального генома. Подобные количественные исследования точечных мутаций, микроделеций и микроинсерций митохондриального генома человека имеют пионерский характер и неоспоримую научную значимость для понимания молекулярных патогенетических механизмов формирования атеросклеротических поражений.

Следует отметить, что метод количественной оценки уровня гетероплазии мутаций митохондриального генома был разработан Сазоновой М.А. с коллегами на базе технологии пиросеквенирования. Идея разработки этого оригинального метода была выдвинута диссертантом лично. С помощью данного метода автор провел эксперименты по определению уровня гетероплазии мутаций мтДНК в интима артерий, результаты которых отражены в диссертационном исследовании. Статистическая обработка результатов, проведенная с помощью самых современных методов, показала их высокую значимость. Практические рекомендации по скринингу пациентов на 11 мутаций и три гаплогруппы митохондриального генома никем ранее не предлагались и обладают высокой степенью новизны. При этом данные практические рекомендации разработаны на основании анализа широкого спектра мутаций митохондриального генома, вследствие чего их достоверность не вызывает сомнений.

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

Отмечу, что научные положения, выводы и практические рекомендации, приведенные Сазоновой М.А в диссертационной работе, являются полностью обоснованными. Автор приводит убедительные аргументы в пользу их обоснованности. Диссертантом доказано, что выявление и использование 11

мутаций и трех гаплогрупп митохондриального генома является обоснованным методом прогноза предрасположенности и диагностики развития атерогенеза. При этом выводы диссертации сделаны на основании содержания работы. Основные положения работы имеют как научное, так и практическое значение. Практические рекомендации, безусловно, полезны для специалистов по медицинской генетике, научных исследователей и практических врачей. Кроме того, результаты диссертационного исследования могут быть использованы в учебном процессе на кафедрах генетики и медицины, в институтах усовершенствования врачей, курсах повышения квалификации медиков и биологов, а также в подготовке аспирантов в научно-исследовательских институтах, специализирующихся на изучении атеросклероза и ишемической болезни сердца.

### **Общая характеристика диссертационной работы**

Диссертация изложена на 350 страницах машинописного текста и содержит: введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, 11 глав собственных результатов исследований, обсуждение полученных результатов, заключение, практические рекомендации, выводы. Список цитируемой литературы включает 615 источников. Работа иллюстрирована 80 таблицами и 51 рисунком. Диссертация Маргариты Александровны Сазоновой соответствует требованиям ВАК, предъявляемым к структуре докторских диссертаций по оформлению, изложению материала, объему и построению.

Глава «Введение» посвящена обоснованию актуальности изучаемой проблемы. В ней рассматриваются основные положения, обуславливающие необходимость использования нового диагностического метода, позволяющего

оценить роль мутаций митохондриального генома в патогенетических процессах, приводящих к атеросклеротическим изменениям стенки сосудов человека. Сформулированы цель и задачи работы.

Обзор литературы состоит из трех разделов. В первом разделе, посвященном медицинским и социальным аспектам атеросклероза, трактуются вопросы важности детального изучения молекулярно-генетических маркеров, как ранних предикторов атеросклеротических поражений. Во втором разделе диссертант освещает современные представления о патогенетических механизмах атеросклероза. В третьем разделе автор анализирует факторы риска атерогенеза, гипотезы возникновения атеросклероза. Автор оценивает роль эндотелиальных клеток, моноцитов-макрофагов и гладкомышечных клеток в этом процессе. Раздел содержит обширный литературный материал, из которого следует, что большинство молекулярно-генетических исследований посвящено поиску ядерных мутаций и полиморфизмов, ассоциированных с атеросклеротическими поражениями, которые, как оказалось, имеют достаточно низкую диагностическую и прогностическую значимость при атеросклерозе. А поиск мутаций в митохондриальном геноме при атеросклерозе проводился, главным образом, на уровне крупных делеций, следствием которых могла быть только полная дисфункция митохондриального генома. Да и количество таких исследований оказалось крайне мало. В совокупности, приведенный в обзоре литературы материал, доказывает целесообразность проведения исследований точечных мутаций, микроделеций и микроинсерций митохондриального генома с целью выявления молекулярно-генетических маркеров атеросклероза.

Во второй главе «Материалы и методы» автор приводит краткую характеристику объектов исследования, включая образцы нормальной интимы и



участки с различными типами атеросклеротических поражений интимы аорты, а также лейкоциты крови. Особо следует отметить раздел, описывающий методику пиросеквенирования. Он написан достаточно подробно с точки зрения воспроизведения другими исследователями. Также подробно описаны и другие методы, которые использовал автор: ультразвунографическое исследование с критериями оценки атеросклеротических бляшек, метод выделения ДНК, гель-электрофорез, полимеразная цепная реакция, трансмиссионная электронная микроскопия и другие.

Третья глава «Результаты» состоит из 11 разделов. Девять разделов посвящены собственным исследованиям. Два раздела - плод совместных исследований 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 которому количество митохондрий со структурными изменениями в нормальной интима не превышало 3,5 %, тогда как в атеросклеротических бляшках достигало 23,6%. Во втором разделе представлен подробный материал по разработке нового оригинального метода количественной оценки мутантного аллеля митохондриального генома, основанного на пиросеквенировании коротких фрагментов ДНК. Описаны способы определения процента гетероплазмии мутаций митохондриального генома, приведены примеры гистограмм исследованных мутаций и уровня гетероплазмии, рассчитанного по пирограммам ПЦР-фрагментов образцов ДНК для мутаций m.3336T>C, m.5178C>A, m.15059G>A, приведена доказательная база воспроизводимости метода измерения степени гетероплазмий. В третьем разделе представлены результаты исследования интимы аорты человека с помощью метода

количественной оценки мутантного аллеля митохондриального генома, в частности, результаты детекции уровня гетероплазии 42 мутаций митохондриального генома в липофильных бляшках и нормальной интиме аорты. Полученные пилотные результаты позволили автору убедительно обосновать необходимость дальнейшего исследования 11 мутаций митохондриального генома на образцах интимы аорты и клеток крови пораженных атеросклерозом индивидов. Представленные в следующих разделах экспериментальные результаты, полученные при анализе нескольких сотен образцов, позволили автору доказать, что степень атеросклеротического поражения ассоциирована с совокупной нагрузкой по 11 репрезентативным мутациям митохондриального генома с 99,9 % вероятностью безошибочного прогноза. В разделе, посвященном анализу уровня гетероплазии в клетках крови, представлены собственные результаты, полученные при исследовании 700 участников. Автором были выявлены ассоциации уровня гетероплазии мутаций митохондриального генома клеток крови с возрастом индивида, с наличием атеросклеротических бляшек в сонных артериях, с толщиной интимо-медиального слоя сонных артерий. При этом было показано, что совокупная мутационная нагрузка 11 исследованных мутаций митохондриального генома клеток крови ассоциирована с 84,2 % атеросклеротических бляшек и с 84,9 % случаев утолщения интимо-медиального слоя сонных артерий человека. Анализ ассоциации гаплогрупп митохондриального генома с атеросклеротическим поражением позволил оценить вероятность появления атеросклеротических бляшек. Обнаружены три, преобладающие при атеросклерозе, гаплогруппы митохондриального генома. Гаплогруппа U является атерогенной, а гаплогруппы M и T - антиатерогенные. Использованный автором метод факторной регрессии полученных данных по 11 мутациям при атеросклерозе гаплотипов митохондриального генома, позволил выявить два преобладающих

при атеросклерозе гаплотипа и обнаружить позиции в митохондриальном геноме, сочетание мутантных аллелей в которых и приводит к появлению этих гаплотипов.

В четвертой главе «Обсуждение» автор приводит сравнительный анализ предложенного оригинального метода количественной оценки мутантного аллеля митохондриального генома, основанного на пиросеквенировании коротких фрагментов ДНК с другими количественными методами анализа мутаций в ДНК. В этой главе дан глубокий анализ полученных результатов; приведены патогенетические связи между обнаруженными автором мутациями в митохондриальном геноме со структурными изменениями в митохондриальных молекулах РНК и белков, что, как следствие, связано с изменениями важнейших митохондриальных функций. Автор рассматривает возможную роль этих изменений в реализации атерогенного или антиатерогенного эффектов в тех зонах сосудистой стенки, в которых были выявлены мутации.

В разделе «Заключение» дается краткая оценка проделанной работы, в которой автор указывает на возможность использования разработанного метода не только для диагностики атеросклероза, но и для анализа уровня гетероплазмий мутаций митохондриального генома при различных патологиях, а также для исследования соматических мутаций в ядерном геноме. Результаты работы автора имеют, несомненно, большой научный интерес и дальнейшее исследование имеет перспективы для широкого использования в клинической практике.

Выводы отражают основные результаты проведенных исследований и соответствуют поставленным задачам.

### **Сведения о полноте публикаций**

Основные результаты исследования опубликованы в 91 научной работе, из которых 35 статей и 16 тезисов опубликованы в ведущих рецензируемых научных журналах, входящих в список ВАК Российской Федерации. Индекс Хирша диссертанта составляет 7,0 по базе «Scopus» и 9,0 по базе РИНЦ.

Результаты диссертационной работы были доложены Сазоновой М.А. на 28 российских и зарубежных конференциях.

Содержание автореферата соответствует содержанию диссертации.

Личный вклад автора диссертации составляет более 90%.

### **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.

Профессор кафедры генетики Академии биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского, Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Южный Федеральный университет» Министерства образования и науки Российской Федерации,

Доктор биологических наук, доцент  
03.02.07 - генетика

Машкина Елена Владимировна

*Машкина*  
*07.02.2019г.*

Личную подпись *Машкина Е.В.*  
удостоверяю  
Ученый секретарь Совета  
Федерального университета  
Мирошниченко О.С.

Полное наименование учреждения, почтовый адрес 344090, Ростовская область, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки 194/1, телефон, e-mail: +79054798481, lenmash@mail.ru

