

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора биологических наук, профессора Трофимова Владимира Александровича 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

До настоящего времени исследование патогенеза атеросклероза на клеточном и молекулярном уровнях остается актуальной проблемой, так как для повышения эффективности лечения атеросклероза требуется разработка новых и модернизация существующих схем лечения. Решающее значение для понимания интимных молекулярных основ патогенеза атеросклероза имеют молекулярно-генетические исследования на клеточном и субклеточном уровнях. Проблема взаимосвязи атеросклероза с мутациями митохондриального генома до настоящего времени является недостаточно изученной, вследствие чего тема диссертации Сазоновой Маргариты Александровны является актуальной.

Диссертационная работа представляет собой целостное исследование, в котором представлены результаты трудоемкого комплексного исследования ассоциации ряда мутаций мтДНК с атеросклеротическими поражениями интимы, утолщением интимо-медиального слоя артерий, а также с нормальным фенотипом, проведенного при помощи разработанного автором метода оценки уровня гетероплазии мутаций митохондриального генома.

Целью работы Сазоновой М.А. явилось выяснение связи мутаций митохондриального генома с патогенетическими процессами, приводящими к атеросклеротическим изменениям сосудистой стенки человека.

Задачи исследования, поставленные диссертантом, вполне соответствуют заявленной цели.

Достоверность и новизна научных положений, выводов и рекомендаций

Диссертационная работа Сазоновой М. А. отличается высокой степенью новизны, начиная с оригинального, разработанного автором метода количественной оценки мутантного аллеля митохондриального генома, и заканчивая экспериментами по определению уровня гетероплазии мутаций мтДНК в интима артерий. Все результаты базируются на полученных автором материалах и результатах их статистической обработки. Эксперименты выполнены с привлечением современных молекулярно-генетических и цитологических методов исследования, и, таким образом, достоверность результатов, полученных диссертантом, не вызывает сомнений.

Степень обоснованности научных положений, выводов и практических рекомендаций диссертации

Все научные положения, выводы и практические рекомендации диссертации аргументированы и обоснованы. Выводы диссертации вытекают из содержания работы. Основные положения работы имеют несомненное научное и практическое значение. Методические подходы, разработанные и использованные диссертантом, являются инновационными и соответствуют мировым стандартам.

Структура и содержание диссертационной работы

Диссертационная работа, выполненная Сазоновой М.А., построена логично, направлена на решение единой комплексной проблемы, имеющей

общемировое значение. Диссертационная работа четко структурирована, изложена хорошим научным языком, дополнена необходимыми, облегчающими восприятие диссертации, иллюстрациями.

Диссертация изложена на 350 страницах машинописного текста и разделена на главы: введение, обзор литературы, материал и методы, результаты, обсуждение, заключение и выводы. Список цитируемой научной литературы содержит 615 источников. Текст иллюстрирован 80 таблицами и 51 рисунком.

Таким образом, по построению, объему, оформлению и изложению материала диссертация Маргариты Александровны Сазоновой соответствует требованиям ВАК, предъявляемым к структуре докторских диссертаций.

В главе «Введение» диссертант характеризует исследуемую проблему, формулирует цели и задачи исследования, дает оценку актуальности и новизны, практической значимости работы, а также представляет положения, выносимые на защиту.

Глава «Обзор литературы», в целом, органично разбита на три раздела, написанные хорошим научным языком. Автором проанализировано большое количество публикаций, имеющих отношение к теме диссертации.

В первом разделе обзора литературы Сазонова М.А. рассматривает медицинские и социальные аспекты атеросклероза, в том числе спектр патологий, сопутствующих атеросклеротическим поражениям, включая сердечно-сосудистые заболевания.

Следующий раздел обзора литературы Сазоновой М.А. посвящен анализу патогенеза атеросклероза. Автор излагает как общие сведения об атеросклерозе, приводя множество ссылок на основоположников изучения проблемы атеросклероза, рассматривает строение нормальной стенки артерии, так и

приводит современные воззрения на проблему атеросклероза и основные гипотезы его возникновения и развития.

В третьем разделе обзора литературы диссертант рассматривает факторы риска атерогенеза, включая молекулярно-генетические. При этом автор указывает на то, что мутации ядерного генома, исследованию которых посвящено достаточно большое количество работ, обладают относительно низкой диагностической и прогностической значимостью, по сравнению с традиционными факторами риска атеросклероза. В то же время, как отмечает Сазонова М.А., связь мутаций митохондриального генома с атеросклерозом является недостаточно изученной и анализируется лишь в нескольких исследованиях, и то на уровне крупных делеций, приводящих к развитию митохондриальных дисфункций.

Особый обоснованный интерес диссертанта вызвали данные научных статей о том, что мутации митохондриального генома в соматических клетках могут накапливаться в течение жизни индивида, оказывая пролонгированное действие, приводя к возникновению и развитию различных заболеваний. В связи с этим выявление и анализ митохондриальных мутаций будут способствовать выяснению глубоких молекулярно-генетических механизмов атерогенеза.

Сазонова М.А. провела тщательный анализ научной литературы по теме патогенеза атеросклероза, что позволило ей обосновать сформированную ею гипотезу об участии митохондриальных мутаций в патогенезе атеросклероза и перейти к выбору методов исследования для решения поставленных задач.

В главе «Материалы и методы» автор дает характеристику основных объектов исследования, таких как образцы интимы аорты и лейкоцитов крови. В работе применены различные современные методы исследования: от трансмиссионной электронной микроскопии до пиросеквенирования. Данные

методы описаны достаточно подробно, что позволит любому исследователю при необходимости воспроизвести представленные эксперименты.

Достоверность результатов усиливает использование репрезентативной представительной выборки образцов ДНК, выделенных из 265 образцов интимы аорты и 700 образцов лейкоцитов крови. Статистический анализ полученных результатов проведен Сазоновой М.А. с помощью набора новейших программ, включенных в пакет IBM SPSS 21,0.

Глава «Результаты» состоит из 11 разделов. Собственные исследования диссертанта описываются в девяти разделах, совместным исследованиям посвящены два раздела. Поскольку в совместных исследованиях диссертант принимал непосредственное участие, то личный вклад Сазоновой М.А. в выполненную диссертационную работу составляет более 90%.

Первый раздел главы «Результаты» посвящен сравнительному описанию структурных изменений в митохондриях клеток участков интимы аорты, пораженных атеросклерозом. Автор показал, что в митохондриях клеток из области атеросклеротических поражений нарушена структура крист, наблюдается отек матрикса, формирование вакуолеподобных и «миелиноподобных» структур. Затем диссертант приводит данные о результатах исследований в атеросклеротических поражениях интимы артерий особенностей митохондриального генома.

Так как для митохондриального генома характерно явление гетероплазмии, то для изучения связи уровня гетероплазмии мутаций с атеросклерозом был разработан, на основе технологии пиросеквенирования, авторский метод количественной оценки мутантного аллеля митохондриального генома, подробно изложенный во втором разделе главы «Результаты».

При использовании Сазоновой М.А. небольшого количества маркеров, оказалось возможным объяснить 84% вариабельности атеросклеротических

поражений, что является довольно высоким показателем. С помощью данного метода оказалось возможным измерять уровень гетероплазии мутаций митохондриального генома и процент соматических мутаций ядерного генома в различных органах и тканях.

Последующие четыре раздела главы «Результаты» посвящены исследованию мутаций митохондриального генома в участках нормальной и пораженной атеросклерозом интимы аорт. В пилотном анализе из 42 мутаций было выбрано 11, связанных с липофиброзными бляшками. В ходе этого исследования диссертантом обнаружены три новые митохондриальные мутации m.652delG, m.961delC и m.5132insAA.

Затем выявленные 11 мутаций были исследованы в более многочисленной выборке участков нормальной и пораженной атеросклерозом интимы аорты индивидов. Всего было исследовано 265 образцов. Это исследование также носит пионерский характер, 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, жировая полоса, липофиброзная бляшка, фиброзная бляшка и участки нормальной, здоровой интимы. Из каждого такого участка интимы 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. При этом суммарное атеросклеротическое поражение интимы аорт было ассоциировано с мутациями митохондриального генома m.3256C>T, m.3336T>C, m.5178C>A,

m.12315G>A, m.14459G>A и m.15059G>A, а мутация m.13513G>A достоверно чаще встречалась у условно здоровых участников исследования.

Восьмой раздел докторской диссертации посвящен исследованию связи мутаций митохондриального генома с атеросклеротическими бляшками и с утолщением интимо-медиального слоя сонных артерий (ИМС СА). Исследована большая репрезентативная выборка участников исследования, составившая 700 человек. У индивидов предварительно было проведено ультрасонографическое и клиническое обследование. Диссертантом были выявлены четыре мутации мтДНК, связанные с атеросклеротическими бляшками (m.652delG, m.3336T>C, m.12315G>A и m.14459G>A) и две мутации, ассоциированные с отсутствием атеросклеротических бляшек (m.13513G>A и m.14846G>A). Две мутации митохондриального генома оказались ассоциированы с утолщением интимо-медиального слоя сонных артерий (m.12315G>A и m.15059G>A), а две другие – с отсутствием такого утолщения (m.13513G>A и m.14846G>A).

Выявленные Сазоновой М.А. пороговые значения уровня гетероплазмии исследованных мутаций, после достижения которых у индивида начинается возникновение и развитие атеросклероза, могут помочь созданию генодиагностического набора для определения предрасположенности к этому заболеванию.

Девятый раздел главы «Результаты» автор посвятил исследованию связи гаплотипов митохондриального генома и атеросклероза. Обнаружены два таких гаплотипа, ассоциированные с атеросклеротическими поражениями. Каждый из них представлен тремя, совместно встречающимися мутациями (A1555G-C5178A-G13513A и 652delG-G12315A-C3256T).

И, наконец, в последних двух разделах главы «Результаты» описано оригинальное исследование ассоциации митохондриальных гаплогрупп с атеросклерозом, выполненное Сазоновой М.А. совместно с лабораторией

популяционной генетики человека МГНЦ. В данном исследовании выявлена одна гаплогруппа (U), связанная с данным заболеванием, и две гаплогруппы (M и T), связанные с отсутствием атеросклероза у участников исследования.

Глава «Обсуждение», в которой автор анализирует собственные фактические данные, написана Сазоновой М.А. достаточно хорошо. В процессе данного анализа диссертант рассматривает возможные генетически обусловленные механизмы возникновения структурных изменений в белковых субъединицах ферментов дыхательной цепи митохондрий, приводящие к нарушению функций митохондрий, возникающему дефициту энергии в клетке, развитию атерогенеза в тех зонах сосудистой стенки, в которых были выявлены мутации.

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

Выводы логичны, полностью соответствуют поставленным задачам и отражают результаты работы.

Практические рекомендации конкретны, актуальны и имеют значение для практики врачей-генетиков.

Список литературы представлен в соответствии со стандартами Минобразования и науки РФ и содержит перечень из 130 отечественных и 485 зарубежных источников.

Диссертацию Сазоновой М.А. можно охарактеризовать как оригинальное, хорошо продуманное и спланированное исследование, которое выполнено на высоком научном и методическом уровне.

Знания, полученные в результате диссертационного исследования Сазоновой Маргариты Александровны, рекомендуется использовать в учебных процессах на кафедрах генетики высших учебных заведений и курсах повышения квалификации медиков и биологов. Кроме того, они будут полезны медицинским генетикам, занимающимся диагностикой атеросклероза и сердечно-сосудистых заболеваний, а также ученым, специализирующимся на исследованиях данных патологий.

Соответствие автореферата основным положениям диссертации

Автореферат диссертации Сазоновой М.А. соответствует основным положениям диссертации: в нем отражены актуальность и степень разработанности темы, научная новизна, теоретическая и практическая значимость и лаконично изложена основная информация, описанная в диссертации.

Сведения о полноте опубликованных научных результатов

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. Двадцать три опубликованные статьи цитируются РИНЦ. Восемнадцать статей и 16 тезисов опубликованы в зарубежных журналах, цитируемых Web of Science и Scopus, двадцать пять из них имеют импакт-фактор от 2,239 до 4,593. По результатам данной работы поданы 2 патентных заявки и опубликована монография. Индекс Хирша диссертанта составляет 7,0 по базе «Scopus» и 9,0 по базе РИНЦ.

Результаты работы доложены Сазоновой М.А. на 28 научных конференциях и конгрессах в России и за рубежом.

Вопросы и замечания:

1) Цель исследования сформулирована как определение связи мутаций митохондриального генома с атеросклеротическими поражениями артериальной стенки человека, что недостаточно полно отражает идеологическую сущность работы и всю совокупность полученных автором результатов.

2) В подразделе внедрение результатов исследования в практику говорится исключительно о возможностях использования полученных результатов в практику. Возникает вопрос об уже внедренных в практику результатах многолетнего исследования? В подразделе публикации автор указывает на наличие двух заявок на изобретение.

3) В главе «Материалы и методы» указано на использование в качестве объекта исследования митохондрий клеток периферической крови. Вопрос: насколько точно митохондрии клеток крови «моделируют» или точнее отражают патологическую ситуацию в интимах кровеносных сосудов.

4) Автор указывает на три ранее не описанные мутации m.652delG, m.961delG, m.5132insAA, но не указывает с какой частотой они встречаются.

Тем не менее, указанные недостатки не в коей мере ни снижают ценности полученных результатов.

Заключение

Таким образом, диссертация Сазоновой Маргариты Александровны 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 актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости, достоверности полученных результатов и обоснованности выводов диссертационная работа Сазоновой Маргариты Александровны 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 кафедрой генетики

ФГБОУ ВО «Национальный

исследовательский Мордовский

государственный университет им. Н.П. Огарёва»

Доктор биологических наук, профессор

14.00.16 – патологическая физиология

В.А. Трофимов

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н. П. Огарёва», 430005 Республика Мордовия, г. Саранск, ул. Большевикская, д. 68, e-mail: geneticlab@yandex.ru
Тел. +7 8342351854

4 февраля 2019 г.

