

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

кандидата медицинских наук Шахтшнейдер Елены Владимировны
на диссертационную работу Королёвой Юлии Александровны
«Метилирование генов микроРНК и их регуляторных элементов при атеросклерозе сонных
артерий», представленную на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук по специальности 1.5.7. Генетика (медицинские науки)

Актуальность темы диссертационной работы

Диссертация Юлии Александровны Королёвой посвящена изучению особенностей эпигенетических модификаций, в виде анализа метилирования ДНК и экспрессии микроРНК, в клетках атеросклеротических бляшек и лейкоцитов крови пациентов с клинически выраженным атеросклерозом сонных артерий.

В настоящее время большое внимание уделяется изучению эпигенетических механизмов регуляции активности генов при формировании многофакторных заболеваний. К таким механизмам, регулирующим экспрессию генов и фенотип клеток, относят метилирование ДНК и действие некодирующих регуляторных РНК, в том числе микроРНК. Экспрессия микроРНК также регулируется метилированием CpG-сайтов в регуляторных элементах генов микроРНК – промоторных участках, вблизи сайта начала транскрипции микроРНК, либо в области энхансеров.

Показано, что микроРНК вовлечены практически во все биологические процессы на всех стадиях развития атеросклероза – от ранних нарушений функции эндотелия до эрозии или разрыва нестабильной атеросклеротической бляшки. При этом сами микроРНК подвержены эпигенетическим изменениям, когда изменение уровня метилирования CpG-сайтов ДНК в области регуляторных элементов генов микроРНК влияет на взаимодействие с транскрипционными факторами и, следовательно, на экспрессию. Исследование метилирования ДНК и экспрессии микроРНК имеет значительный потенциал для молекулярной классификации образцов атеросклеротических бляшек, а также для расширения понимания патогенеза заболевания и разработки персонализированных терапевтических подходов.

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

В ходе выполнения диссертационной работы применены методы клинического и

инструментального обследования пациентов, всем пациентам по показаниям проведена каротидная эндартерэктомия. Для части образцов атеросклеротических бляшек сонных артерий выполнен гистологический анализ. Обоснованность и достоверность научных положений и выводов диссертации подтверждаются использованием в работе репрезентативной выборки, современных методов молекулярно-генетических исследований, включающих таргетное бисульфитное секвенирование регуляторных генов микроРНК, анализ метилирования ДНК на микрочипах, микроРНК секвенирование, а также релевантных подходов математической статистики и биоинформатики.

В работе чётко обозначены основные положения, выносимые на защиту. Результаты исследования представлены достаточно полно и информативно. Выводы соответствуют цели и задачам исследования. Основные результаты исследования опубликованы в рецензируемых научных журналах.

Новизна научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Автором впервые охарактеризован уровень метилирования регуляторных элементов и непосредственно генов *MIR10B*, *MIR21*, *MIR100*, *MIR127* и *MIR143* в сонных артериях, больших подкожных венах и лейкоцитах крови у пациентов с клинически выраженным атеросклерозом. Выполнена оценка ассоциации метилирования ДНК в области данных элементов с осложненным течением атеросклероза в отношении острых сосудистых событий и гистологических параметров нестабильной атеросклеротической бляшки сонных артерий.

В настоящем исследовании проведен комплексный анализ профилей метилирования ДНК и экспрессии микроРНК в образцах атеросклеротических бляшек сонных артерий в зависимости от гистологически определённой степени их нестабильности. Впервые в настоящем исследовании выявлены ключевые CpG-сайты, уровень метилирования которых отрицательно и положительно коррелирует с экспрессией микроРНК в атеросклеротических бляшках сонных артерий.

В результате проведённого исследования были получены новые знания, углубляющие понимание эпигенетической регуляции генов микроРНК и их роли в нестабильности атеросклеротических бляшек. 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 в рецензируемых журналах, рекомендованных Перечнем ВАК Российской Федерации, опубликовано 7 статей, отражающих основные результаты диссертации. Статьи опубликованы в журналах, соответствующих заявленной специальности.

Оценка содержания диссертации

Диссертационная работа Королёвой Юлии Александровны построена по классической форме и содержит введение, три главы, заключение, и 5 приложений. Материалы диссертации представлены на 203 страницах машинописного текста. Прилагаемая библиография содержит ссылки на 278 источников. Работа наглядно иллюстрирована 12 таблицами и 46 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 атеросклероза и его осложнений, критерии нестабильности атеросклеротической бляшки, раскрывается роль эпигенома – микроРНК и метилирования ДНК – в поддержании и модификации фенотипа атеросклеротической бляшки. Автором отмечается участие микроРНК в различных процессах, в том числе на уровне отдельных клеток и молекул. Подробно описаны результаты предшествующих научных исследований, рассматривающие экспрессию микроРНК при нестабильном течении атеросклероза сонных артерий у человека. Литературный обзор отражает современное состояние проблемы изучения метилирования ДНК в области регуляторных элементов и отдельных генов микроРНК в клетках нестабильных атеросклеротических бляшек сонных артерий и завершается аргументированным заключением.

В главе «Материалы и методы» подробно представлены технологии молекулярно-генетических исследований. Приводится клиническая характеристика групп пациентов. Проведение диссертационного исследования одобрено Комитетом по биомедицинской этике НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ (протокол № 4 от 25.11.2019 г.). От всех

пациентов, включенных в исследование, получено информированное согласие на участие в эксперименте. Дизайн исследования представлен в виде наглядной схемы.

Глава 3 отражает полученные диссертантом результаты исследования. Автором представлены результаты анализа уровня метилирования регуляторных элементов и отдельных генов микроРНК в атеросклеротических бляшках и интактных сосудах (сонных артериях, больших подкожных венах), а также в лейкоцитах крови пациентов с атеросклерозом сонных артерий и контрольной группы. Показаны различия уровня метилирования в области регуляторных элементов и «тел» генов *MIR10B*, *MIR21*, *MIR100*, *MIR127* и *MIR143* между лейкоцитами периферической крови и тканями сосудов у пациентов с клинически выраженным атеросклерозом.

Во втором разделе Главы 3 показаны результаты использования алгоритма деконволюции клеточного состава сонных артерий и представлены дифференциально метилированные CpG-сайты между группами сравнения: стабильные атеросклеротические бляшки сонных артерий, нестабильные атеросклеротические бляшки сонных артерий и интактные участки сонных артерий. Показано преобладание гипометилированных CpG-сайтов в области генов микроРНК в атеросклеротических бляшках по сравнению с интактными сонными артериями.

Заключительный раздел Главы 3 посвящен результатам анализа ассоциаций между метилированием CpG-сайтов и экспрессией микроРНК в атеросклеротических бляшках: идентифицировано 20 пар «CpG-сайт – микроРНК» с корреляцией метилирования и экспрессии. Приведены результаты систематического поиска мишеней для микроРНК из данных пар в различных базах данных.

При обсуждении собственных результатов автор проводит сравнение с полученными ранее по этой теме данными, опубликованными в отечественных и зарубежных источниках. Результаты проведенного исследования расширяют имеющиеся представления о молекулярных механизмах атеросклероза, добавляя новые данные об эпигенетических компонентах и их взаимосвязи.

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

Автореферат диссертации Королёвой Юлии Александровны полностью соответствует основным положениям диссертации.

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

Результаты диссертационного исследования Королёвой Юлии Александровны открывают новые перспективы для диагностики и терапии атеросклероза на молекулярном уровне. Выявленные закономерности в метилировании регуляторных областей генов микроРНК и их ассоциация с экспрессией данных молекул позволяют глубже понять механизмы, лежащие в основе нестабильности атеросклеротических бляшек. В работе подчеркнута существенная роль клеточного состава сосудов в отношении анализа уровня метилирования в области генов микроРНК и их регуляторных элементов при развитии нестабильности атеросклеротического поражения сонных артерий. Кроме того, подходы, применённые в работе, могут быть адаптированы для изучения эпигенетических механизмов при других заболеваниях, расширяя их использование в клинической практике.

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

1. Проводилась ли оценка локализации атеросклеротических бляшек в сонных артериях (высокое/низкое расположение) или в зависимости от геометрии сонной артерии (угол бифуркации и радиус) у пациентов, включенных в исследование? Проводился ли анализ экспрессии микроРНК в зависимости от локализации бляшек?
2. В Вашей работе установлена ассоциация уровня метилирования ДНК в области регуляторных элементов и кодирующих частей генов *MIR10B*, *MIR21*, *MIR143* и *MIR127* в атеросклеротической бляшке с отдельными параметрами гистологической нестабильности, а в лейкоцитах периферической крови пациентов – с клинически выраженным атеросклерозом сонных артерий и его патогенетически значимыми признаками. Уточните, по Вашему мнению, какая микроРНК представляет наибольший интерес в качестве потенциального биомаркера для прогнозирования осложненного течения атеросклероза сонных артерий?
3. Есть ли доклинические исследования, в которых рассматриваются обозначенные в Вашей работе эпигенетически регулируемые микроРНК (*miR-10b* и *miR-27b*) и их мишени (*KLF4*, *NCOR2*, *ABCA1*, *SEMA6A* и *ROR1*) в качестве терапевтических мишеней нестабильного течения атеросклероза?

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Королёвой Юлии Александровны «Метилирование генов микроРНК и их регуляторных элементов при атеросклерозе сонных артерий», выполненная

под руководством д.м.н. Назаренко М.С. и представленная к защите на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.7. Генетика (медицинские науки), является завершенной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение научной задачи по изучению особенностей метилирования в генах микроРНК и их регуляторных элементах при формировании и нестабильном течении клинически выраженного атеросклероза сонных артерий, что имеет существенное значение для формирования фундаментальных знаний о прогрессировании атеросклеротического поражения сосудов у человека.

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 ред. от 25.01.2024 г.) предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор Королёва Юлия Александровна заслуживает присуждения искомой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.7. Генетика (медицинские науки).

Официальный оппонент:

Ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярно-генетических исследований терапевтических заболеваний Научно-исследовательского института терапии и профилактической медицины – филиала Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», 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

« 26 » декабря 2024 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>