

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

кандидата химических наук **Котелевцева Юрия Васильевича**
на диссертацию Синёва Василия Владимировича, выполненной на тему:
«Клеточная модель митохондриальной дисфункции при атеросклерозе»
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальностям 1.5.22. – Клеточная биология и 1.5.7. – Генетика.

Актуальность темы исследования

Атеросклероз является основным доказанным фактором риска сердечно-сосудистых заболеваний (ИБС, инфаркт миокарда, нарушения кровообращения мозга, нижних конечностей, органов брюшной полости и т.п.). Болезни сердечно-сосудистой системы занимают первое место по потере трудоспособности, инвалидности и смертности населения экономически развитых стран мира, к которым относится и Россия.

В лаборатории автора ведутся исследования, направленные на поиск популяционных ассоциаций атеросклероза с некоторыми мутациями митохондриального генома. Эта гипотеза находит подтверждение в нескольких независимых публикациях. Мутации митохондриальной ДНК, чаще всего носят характер однонуклеотидных полиморфизмов. Каждая митохондрия содержит по меньшей мере несколько десятков кольцевых хромосом, которые могут отличаться по имеющимся нуклеотидным заменам. Как правило митохондриальный геном индивидуального пробанда содержит несколько полиморфизмов, как правило в различных митохондриальных хромосомах. Это явление получило название – гетероплазмия. При изучении ассоциации митохондриальных мутаций с фенотипическими проявлениями, а также с патологическим фенотипом, важна и количественная оценка мутантного аллеля митохондриального генома.

В основе ряда митохондриальных дисфункций лежат митохондриальные мутации, приводящие к развитию различных заболеваний

человека. Считается, что в результате селекции митохондрий, в особенности в тканях с высоким потреблением энергии, уровень гетероплазмии мутаций митохондриального генома может существенно изменяться, что приводит к различной пенетрантности признаков, ассоциированных с конкретной мутацией. Уровень гетероплазмии определяется по частоте встречаемости мутаций в тканях с использованием различных молекулярно-генетических методов, такие как ПЦР-РВ, пиросеквенирование и «секвенирование нового поколения».

Для изучения функциональных особенностей митохондрий с различными мутациями мтДНК используются цитоплазматические гибриды. Автор предлагает использование митохондрий с различным уровнем гетероплазмии мутаций митохондриального генома, в частности ассоциированных с атеросклерозом, для создания наглядной клеточной модели изучения связи мутаций митохондриального генома и процессов атерогенеза.

В.В. Синёвым был проведён тщательный анализ литературных данных, посвященных изучению создания цитоплазматических гибридов (цибридов) и вариабельности гетероплазмии мутаций митохондриального генома в различных типах клеток и тканей человека. Список литературы содержит 92 источника, из них 17 российских и 75 зарубежных. Обзор хорошо структурирован и написан в хорошем стиле.

Новизна полученных результатов, положений, выводов и рекомендаций

При помощи слияния тромбоцитов, отобранных путем предварительного генотипирования из донорской крови более чем 2000 добровольцев, В.В. Синёву удалось создать две уникальные цибридные линии с высоким и низким уровнем гетероплазмии мутаций митохондриального генома, ассоциированных с атеросклерозом. В цибридных линиях были

определены характеристические и функциональные параметры клеток, зависящие от митохондрий на гибридной клеточной модели. Автором впервые определена степень гетероплазмии мутаций митохондриального генома m.13513G>A, m.3256C>T, m.3336T>C, m.12315G>A и m.1555A>G в различных тканях человека. Впервые определен уровень гетероплазмии мутаций митохондриального генома m.13513G>A, m.3256C>T, m.3336T>C, m.12315G>A и m.1555A>G в различных типах клеток крови человека. Полученные данные о вариабельности мутаций митохондриального генома позволяют судить о распределении нормального и мутантного аллеля митохондриального генома в онтогенезе.

Таким образом, описанный подход может быть использован в качестве клеточной модели для изучения зависимости процессов атерогенеза от полиморфизмов мтДНК. Однако, очевидно, что для этого потребуются создание большой панели таких линий от пациентов с различным уровнем атеросклеротического поражения сосудов. По результатам исследования, несомненно, получены новые знания о гетероплазмии митохондриального генома, а именно её вариабельности по различным типам клеток и тканей человека.

Достоверность, степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций не вызывает сомнений. Результаты получены с использованием необходимого и достаточного количества исследованных образцов (21 образец каждого вида тканей аутопсийного материала, 134 образца буккального эпителия и цельной крови и 41 образец трех фракций лейкоцитов).

В ходе выполнения диссертационной работы В.В. Синёв использовал современные, адекватные поставленным задачам, методы, позволившие создать цитоплазматические гибриды: ПЭГ-слияние, выделение тромбоцитов, культивирование клеток в контролируемых условиях среды; цитологические методы, использованные для изучения клеточной модели: измерение

мембранного потенциала и совокупной массы митохондрий с помощью конфокальной микроскопии; и биохимические методы, позволившие провести сравнительный анализ клеточного дыхания. Также использовались генетические методы, которые позволили определить уровень мутационной нагрузки митохондриального генома в различных типах клеток и тканей человека: полимеразной цепной реакции, количественное определение уровня гетероплазмии мутаций митохондриального генома с помощью пиросеквенирования. Результаты работы проанализированы с корректным применением статистических методов.

Выводы объективно и полноценно отражают результаты проведенных исследований. Диссертация охватывает основные вопросы поставленной научной задачи, что подтверждается наличием последовательного плана исследования и объемным методологическим аппаратом.

Диссертационная работа написана хорошим литературным языком, содержит введение, литературный обзор, главы материалы и методы, результаты исследования, обсуждение результатов, выводы, заключение и практические рекомендации, проиллюстрирована 22 рисунками с микрофотографиями и графиками, данные представлены в 17 таблицах. Положения и выводы диссертации достоверны, логично вытекают из задач и результатов. Материалы диссертации представлены на научных конференциях. По материалам диссертационной работы опубликовано 8 научных работ, в том числе 5 оригинальных и 3 обзорные статьи в журналах, входящих в перечень рецензируемых научных изданий ВАК РФ.

Научно-практическая значимость полученных данных

Создана клеточная модель для изучения функционирования митохондрий. Создана модель изучения генетических aberrаций в митохондриальном геноме на клеточных линиях. По результатам исследования получены новые знания о гетероплазмии митохондриального

генома, а именно её вариабельности по различным типам клеток и тканей человека. Эти результаты подтверждают гипотезу селекции генетических вариантов митохондриальных хромосом, особенно в клетках с высоким потреблением энергии (миоциты сосочковых мышц миокарда и скелетной мускулатуры) и быстро обновляющихся клетках (буккальный эпителий).

Личный вклад автора не вызывает сомнений. Результаты работы В.В. Синёва основаны на современных данных о вариабельности гетероплазмии мутаций митохондриального генома и имеют несомненную значимость для научного и практического применения.

Результаты исследования используются в научно-исследовательской работе в лаборатории клеточной и молекулярной патологии сердечно-сосудистой системы НИИМЧ им. акад. А.П. Авцына ФГБНУ "РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского".

Принципиальных замечаний по представленному диссертационному исследованию нет.

Заключение

Диссертация В.В. Синёва на тему: «Клеточная модель митохондриальной дисфункции при атеросклерозе» является научно-квалификационной работой, в которой решена актуальная задача – создание и исследование функциональной клеточной модели с разным уровнем гетероплазмии мутаций митохондриального генома для изучения митохондриальной дисфункции. Изучены особенности вариабельности гетероплазмии в различных типах клеток и тканей человека. Результаты работы имеют важное фундаментальное и практическое значение для клеточной биологии, биохимии и генетики.

По актуальности, новизне, научному и методическому уровню, теоретической и практической значимости, достоверности полученных результатов диссертация Синёва Василия Владимировича соответствует требованиям п.9 «Положения о присуждении ученых степеней» (Постановление Правительства РФ от 24.09.2013 г. №842), предъявляемым к диссертациям, представленным на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.22. – Клеточная биология и 1.5.7 – Генетика, а автор заслуживает присвоения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.22. – Клеточная биология и 1.5.7 – Генетика.

Профессор Центра Нейронаук и
реабилитации мозга имени В.Л.Зельмана
Сколковского института науки и технологии
кандидат химических наук

Ю.В. Котелевцев

Подпись Котелевцева Ю.В.

ЗАВЕРЯЮ

Старший вице-президент по развитию
Сколковского института науки и технологии
кандидат технических наук

А.А. Сафонов