

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора медицинских наук **Казубской Татьяны Павловны**

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, 1.5.7 – Генетика

Актуальность темы исследования

Митохондриальные заболевания разнообразны и их клиническое течение зависит от локализации, величины дефекта и различного распределения дефектных митохондрий в органах. Митохондрии - клеточные органеллы управляющие многими процессами в клетке. Нарушение функции митохондрий и структурные и качественные изменения в митохондриальной ДНК (мтДНК) могут быть непосредственно вовлечены в развитие множественных механизмов, участвующих в различных патологических процессах. В настоящее время есть убедительные доказательства, что на развитие атеросклероза могут влиять изменения, как в ядерном, так и в митохондриальном геноме человека. Недавние исследования показали, что уровень гетероплазмии некоторых соматических мутаций мтДНК связан с коронарным атеросклерозом. Выявлен ряд мутаций мтДНК, для которых уровень гетероплазмии был положительно или отрицательно связан с атеросклерозом, в том числе, на ранних и субклинических стадиях заболевания. Мутации мтДНК, связанные с атеросклерозом, представляют собой один из наименее изученных аспектов в патогенезе заболевания, который может открыть интересные возможности для установления новых молекулярных маркеров генетической предрасположенности к атеросклерозу и родственным патологическим состояниям, и, возможно, новых точек терапевтического вмешательства, и эта область нуждается в дальнейшем изучении. Атеросклероз является основным фактором риска развития сердечнососудистых заболеваний, в основе которых лежит эндотелиальная артериальная дисфункция. Диагностика атеросклероза на ранних стадиях и

профилактика этого заболевания является важной проблемой. Ишемическая болезнь сердца, инфаркт миокарда, нарушение кровообращения мозга, конечностей и ряд других заболеваний связаны с атеросклерозом и являются причиной потери трудоспособности, инвалидности и смертности, и, в последнее время, все чаще возникают у лиц молодого возраста.

Митохондриальный геном отличается выраженной нестабильностью, в нем часто возникают мутации. Пенетрантность и экспрессивность таких мутаций зависит от генотипа и уровня гетероплазмии (соотношения мутантных и нормальных копий мтДНК). Поэтому при исследовании связи мутаций мтДНК с заболеваниями необходимо изучение не только наличия или отсутствия мутации, но и количественная оценка мутантного аллеля митохондриального генома (уровня гетероплазмии). Для этой цели применяются такие методы, как полимеразная цепная реакция в реальном времени, пиросеквенирование и NGS (секвенирование нового поколения).

Для изучения функции митохондриального генома может быть использована вариабельность мутаций мтДНК в различных нормальных клетках и типах тканей человека и сопоставления этого распределения с таковыми при атеросклерозе. Различный уровень гетероплазмии мутаций митохондрий, связанных с атеросклерозом может быть основой для создания цитоплазматических гибридов (цибридов), которые могут служить клеточной моделью для изучения митохондриальной дисфункции, позволяющей судить об особенностях распределения этих мутаций при атеросклерозе.

В обзоре литературных данных В.В. Синевым проанализировано большое количество публикаций связанных с созданием цитоплазматических гибридов и клеточных моделей для изучения дисфункций митохондрий. Приводятся современные сведения по изучению вариабельности мутаций мтДНК в различных типах тканей и сопоставления этого распределения с различными заболеваниями человека. Список литературы, включающий 92 источника, из них 17 российских и 75 зарубежных.

Новизна полученных результатов, положений, выводов и рекомендаций.

Хорошо построенная методология работы позволила В.В. Синеву на основе культуры ТНР-1 создать две отличающиеся по мутационной нагрузке линии клеток с высоким и низким уровнем гетероплазмии ассоциированных с атеросклерозом митохондриальных мутаций. Впервые определены степень и уровень гетероплазмии мутаций митохондриального генома m.13513G>A, m.3256C>T, m.3336T>C, m.12315G>A и m.1555A>G в различных клетках и тканях человека. Созданные клеточные линии позволяют проводить оценку функционального состояния митохондрий изучаемой модели и их митохондриальной эффективности в различных клетках и типах тканей человека. Получены новые данные о вариабельности мутаций (а именно, распределении нормального и мутантного аллеля) митохондриального генома). Получены новые данные об уровне гетероплазмии исследуемых мутаций митохондриального генома в различных типах клеток и тканей человека, которые имеют большое значение в дальнейшем изучении атерогенеза и сердечно-сосудистых заболеваний, в частности, для изучения эндотелиальной артериальной дисфункции. Создана клеточная гибридная модель для изучения механизма генетических aberrаций в митохондриальном геноме, и возникающей при этом митохондриальной дисфункции.

Достоверность, степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций несомненна. Исследование выполнено с использованием достаточного количества необходимых образцов клеток и тканей (включая 21 образец каждого вида тканей аутопсийного материала, по 134 образца букального эпителия и цельной крови и по 41 образцу трех фракций лейкоцитов).

Эксперимент выполнен В.В. Синёвым с привлечением современных адекватных поставленным задачам методов, и, таким образом, достоверность полученных диссертантом результатов, не вызывает сомнений.

В представленной работе использовались культуральные 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); биохимические методы, для сравнительного анализа клеточного дыхания.

Кроме того, для определения уровня мутационной нагрузки митохондриального генома в различных типах клеток и тканей человека, использовались молекулярно-генетические методы: выделение ДНК методом фенол-хлороформной экстракции, метод полимеразной цепной реакции, количественное определение уровня гетероплазмии мутаций митохондриального генома с помощью пиросеквенирования. Объективность полученных данных подтверждена статистическим анализом.

Выполненная В.В. Синёвым работа построена логично, выводы объективно отражают результаты проведенных исследований. Диссертационная работа включает основные вопросы поставленной научной задачи, подробный план и комплекс методов исследования, который хорошо иллюстрирован, описан с необходимой степенью полноты, которая позволяет представленные эксперименты воспроизвести любому заинтересованному в них исследователю. Все результаты хорошо обоснованы, базируются на полученных материалах и их статистической обработке, направленных на решение единой комплексной проблемы.

Диссертация четко структурирована, изложена хорошим научным языком, дополнена необходимыми иллюстрациями (22 рисунками с микрофотографиями, графиками, данные представлены в 17 таблицах), которые облегчают восприятие. Положения и выводы диссертации достоверны, логично вытекают из задач и результатов. Материалы диссертации представлены на научных конференциях, по материалам исследования опубликовано 8 научных работ, в том числе 5 оригинальные и

3 обзорные статьи в журналах, входящих в перечень рецензируемых научных изданий ВАК РФ.

Научно-практическая значимость полученных данных.

Создана клеточная цибридная модель как механизм генетических aberrаций в митохондриальном геноме и, возникающей при этом, митохондриальной дисфункции. По результатам исследования получена информация, позволяющая повысить уровень знаний о гетероплазмии митохондриального генома, а именно её вариабельности в различных типах клеток и тканей человека.

Личный вклад автора не вызывает сомнений. Результаты работы В.В. Синева базируются на оригинальном методе количественной оценки мутантного аллеля митохондриального генома, на современных данных о вариабельности гетероплазмии мутаций мтДНК и имеют несомненную значимость для научного и практического применения.

Основные результаты диссертационного исследования В.В. Синева внедрены и используются в научно-исследовательской работе 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.

Диссертационная работа В.В. Синёва на тему: «Клеточная модель митохондриальной дисфункции при атеросклерозе» является завершённой и цельной научно-квалификационной работой, в которой решена актуальная задача - создана цибридная модель для изучения митохондриальной дисфункции при атеросклерозе. Получены новые научно обоснованные данные об уровне гетероплазмии исследуемых мутаций митохондриального генома в различных типах клеток и тканей человека, что имеет большое значение в дальнейшем изучении патогенеза атеросклероза и сердечно-

сосудистых заболеваний, в частности, для изучения эндотелиальной артериальной дисфункции. Исследование проведено с использованием широкого набора современных методов, содержит оригинальные научные результаты с высокой степенью новизны. Результаты работы имеют фундаментальное и практическое значение для клеточной биологии, генетики, биохимии.

По актуальности, новизне, научному и методическому уровню, теоретической и практической значимости, достоверности полученных результатов диссертация Синёва Василия Владимировича соответствует требованиям п.9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного (Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013г., №842), предъявляемым к диссертациям 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.

Старший научный сотрудник
лаборатории клинической цитологии
отдела морфологической и молекулярно-
генетической диагностики опухолей
ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России
док. мед. наук,

Т. П. Казубская

31 октября 2022г.

Подпись Казубской Т.П

ЗАВЕРЯЮ

Ученый секретарь ФГБУ «НМИЦ онкологии
им. Н.Н.Блохина» Минздрава России
канд.мед.наук



И.Ю. Кубасова